

**Aus dem Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie
der Philipps-Universität Marburg
Komm. Institutsleiter: Prof. Dr. R. Lill**

**Vergleichende Untersuchungen zur Virusreplikation
in humanen Fibroblasten und der Astrozytom-Zelllinie
U373-MG nach Infektion mit dem humanen
Zytomegalievirus**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von

**Thomas Klöckl
aus Homberg / Efze**

Marburg 2001

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 18.10.2001.**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. H. F. Kern

Korreferent: Prof. Dr. Renz

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Taxonomie	1
1.2	Klinische Aspekte – Die Rolle des humanen Zytomegalievirus als Krankheitserreger	2
1.3	Struktur des humanen Zytomegalievirus	
1.3.1	Morphologie	4
1.3.2	Genom	6
1.3.3	Biochemie	7
1.4	Infektionszyklus und Morphogenese	
1.4.1	Infektion	11
1.4.2	Kapsidmorphogenese	12
1.4.3	Transport- und Reifungsknospung	14
1.5	DNA-Replikation und Genexpression des humanen Zytomegalievirus	16
1.6	In vitro Zellsysteme und Permissivität	18
1.7	HCMV und Zellzyklus	20
1.8	Morphologische Veränderungen in HCMV-infizierten Zellen	21
1.9	Fragestellung der Arbeit	23

2 Material

2.1	Geräte	25
2.2	Chemikalien	25
2.3	Mediengrundstoffe	26
2.4	Antibiotika	26
2.5	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	26
2.6	Verwendete Antikörper	27

3	Methoden	
3.1	Zellkultur	
3.1.1	Medien und Lösungen.....	28
3.1.2	Kultivierung.....	29
3.2	Zellbiologische und virologische Methoden	
3.2.1	Virus-Stamm.....	30
3.2.2	Herstellung eines Virusstocks.....	30
3.2.3	Virustitration.....	30
3.2.4	Experimentelle Infektion.....	33
3.3	Immunologische Methoden	
3.3.1	Indirekte Doppelimmunfluoreszenz-Färbung.....	33
3.3.2	Detektion von gB auf der Zelloberfläche.....	35
3.4	Elektronenmikroskopie.....	36
4	Ergebnisse	
4.1	Untersuchungen zur Freisetzung infektiöser Partikel.....	37
4.2	Untersuchungen zur Proteinexpression der unterschiedlichen Phasen der viralen Replikation.....	39
4.3	Ultrastrukturelle Untersuchungen infizierter Zellen.....	46
4.5	Expression von gB auf der Zelloberfläche.....	53
5	Diskussion.....	57
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis.....	71
8	Anhang.....	84

1 Einleitung

1.1 Taxonomie

Die Mitglieder der Familie *Herpesviridae* sind durch folgende Merkmale charakterisiert: Sie besitzen ein Genom aus doppelsträngiger DNA, das in einem ikosaedrischen Kapsid verpackt und von einer lipidhaltigen Hülle umgeben ist. Außerdem charakteristisch für diese Familie ist das Vorhandensein einer sogenannten Matrix, die sich zwischen Kapsid und Hülle befindet.

Die Familie *Herpesviridae* läßt sich typischerweise in drei Unterfamilien unterteilen: *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae*.

Von den zahlreichen in der Natur vorkommenden Mitgliedern der Familie *Herpesviridae* sind bisher nur elf humanpathogene Mitglieder bekannt. Zu den wichtigsten humanpathogenen Mitgliedern zählen:

- *Alphavirinae*:
 - *Herpes-simplex Virus 1* (HSV 1, humanes Herpesvirus 1)
 - *Herpes-simplex Virus 2* (HSV 2, humanes Herpesvirus 2)
 - *Varizella-Zoster-Virus* (humanes Herpesvirus 3)
- *Betavirinae*:
 - *humanes Zytomegalievirus* (HCMV, humanes Herpesvirus 5)
 - humanes Herpesvirus 6
- *Gammavirinae*:
 - *Epstein-Barr-Virus* (EBV, humanes Herpesvirus 4)
 - Karposi's Sarkoma-assoziiertes Herpesvirus (humanes Herpesvirus 8)

Die Einteilung der Familie *Herpesviridae* in die unterschiedlichen Gattungen beruht nicht auf morphologischen Unterschieden, sondern leitet sich von den unterschiedlichen biologischen Eigenschaften ab:

Alphavirinae: Sie zeichnen sich durch ein variables Wirtsspektrum, einen relativ kurzen Replikationszyklus, eine schnelle Verbreitung in Kulturen, eine effektive Lyse infizierter Zellen und die Fähigkeit zur latenten Infektion aus.

Betavirinae: Charakteristisch für diese Unterfamilie ist ein sehr eingeschränktes Wirtsspektrum, ein relativ langer Replikationszyklus, eine langsame Verbreitung in Kulturen und oft eine Vergrößerung infizierter Zellen (Zytomegalie).

Gammavirinae (lymphoproliferative Viren): Die Viren dieser Unterfamilie sind sehr speziesspezifisch und replizieren sich in erster Linie in lymphatischen Zellen.

1.2 Klinische Aspekte - Die Rolle des humanen Zytomegalievirus als Krankheitserreger (nach Britt und Alford, 1996)

Das *humane Zytomegalievirus* ist ein ubiquitär vorkommendes Virus mit hoher Spezies-Spezifität (Weller, 1971). Die Übertragung des Virus erfolgt zum einen auf direktem Wege durch Bluttransfusionen, Transplantationen und als intrauterine Infektion oder auf indirektem Wege als Tröpfchen- und Schmierinfektion, wobei das Virus in Speichel, Urin, Vaginalsekret, Sperma, Muttermilch, Tränen, Stuhl und Blut nachgewiesen werden kann. Der Mensch stellt das einzige Erregerreservoir da. Nach einer primären Infektion wird das Virus noch eine längere Zeit ausgeschieden.

Die Durchseuchungsrate liegt, abhängig vom Lebensstandard und der Bevölkerungsdichte, bei etwa 80 %, wobei die meisten Menschen bereits in der Kindheit infiziert werden. In einigen Gebieten der Erde liegt die Durchseuchungsrate sogar bei 90 - 100 % (Lang, 1975).

Die klinische Symptomatik bietet je nach Lebensalter und Immunstatus des Infizierten sehr unterschiedliche Erscheinungsbilder. Die primäre Infektion verläuft bei den meisten immunkompetenten Adulten zu etwa 99 % inapparent, jedoch kommt es in 1% der Fälle zu einem mononukleose-ähnlichen Syndrom mit Fieber, Myalgie, allgemeinem Krankheitsgefühl, atypischer Lymphozytose und zervikaler Lymphadenopathie. Als Komplikationen können eine interstitielle Pneumonie, Hepatitis, ZNS-Beteiligung und aseptische Meningitis auftreten.

Die intrauterine Infektion, meist als Folge einer primären Infektion der Mutter und seltener als Reaktivierung einer Infektion, ist die häufigste kongenitale virale Infektion und betrifft 0,2 - 2,2 % aller Lebendgeburten (Stagno et al., 1982). Davon tragen 10 - 15% der infizierten Neugeborenen bleibende neurologische Schäden davon (Fowler et al., 1992).

Klinisch bieten die intrauterin infizierten Neugeborenen sehr unterschiedliche Verlaufsformen von mild über Hepatomegalie, Thrombozytopenie, Mikrozephalie, Chorioretinitis, Hepatitis, geistiger Retardierung sowie Entwicklungsstörungen von Sprache und Gehör, bis zu lebensbedrohlichen Organdysfunktionen mit einer Mortalität von 11 - 20%.

Die perinatale Infektion über die Geburtswege der Mutter und die Muttermilch bleibt meistens folgenlos.

Neben der intrauterinen Infektion ist die Infektion oder Reaktivierung bei Transplantationspatienten, bedingt durch die therapeutisch notwendige Immunsuppression, von besonderer Bedeutung. Die Primärinfektion verläuft bei diesen Patienten wesentlich schwerer als die Reaktivierung. Die Inzidenz einer Erkrankung durch das humane *Zytomegalievirus* wird hier auf 20 - 60 % geschätzt. Klinische Zeichen sind lang andauerndes Fieber, Leukopenie, Thrombozytopenie, atypische Lymphozytose und erhöhte Lebertransaminasen. Lebensbedrohliche Komplikationen, wie schwere Infektion des Gastrointestinaltraktes mit Perforation des Darms, Hepatitis und Pneumonie, können auftreten. Besonders schwere Verläufe einer HCMV-Pneumonie können nach einer allogenen Knochenmarktransplantation auftreten.

Ebenfalls gefährdet sind, aufgrund ihres geschwächten Immunsystems, an AIDS erkrankte Patienten, wobei die HCMV-Infektion zu den wichtigsten opportunistischen Infektionen gezählt wird.

Klinisch kann das humane Zytomegalievirus bei AIDS Patienten jedes Organ, sogar die Haut, befallen (Jacobson et al., 1988). Die am meisten befallenen Organe sind jedoch Lunge, ZNS und Gastrointestinaltrakt.

Die häufigste ZNS-Manifestation ist eine HCMV-Retinitis, die zur Erblindung führen kann. Zu den Manifestationen im Gastrointestinaltrakt zählen Ösophagitis, Gastritis und Enterokolitis, weniger häufig sind Erkrankungen der Gallenwege und des Pankreas.

Die interstitielle HCMV-Pneumonie stellt eine unter Umständen lebensbedrohliche Infektion der Lunge dar.

Eine Mitbeteiligung des Virus an der Entstehung von malignen Tumoren wird immer wieder diskutiert (Cinatl et al., 1996). Es gibt Hinweise, dass die frühen Genprodukte von HCMV

die Apoptose durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 blockieren, und das Virus somit an der Onkogenese beteiligt ist.

Insbesondere an der Entstehung von Zervixkarinomen und Adenokarzinomen von Prostata und Colon scheint HCMV mitbeteiligt zu sein. Ein Onkogen, mtrII (morphologic transforming regions II), das an p53 bindet und dieses inaktiviert, wurde identifiziert (Doniger et al., 1999).

Ebenso ist HCMV wahrscheinlich an der Stenosierung von traumatisierten und transplantierten Koronarrarterien beteiligt (Speir et al., 1994)

Zur Behandlung einer HCMV-Infektion stehen zwei Medikamente zur Verfügung, das Nukleotid-Analogon (Ganciclovir, GCV) und der HCMV DNA-Polymerase-Inhibitor Forcarnet. Diese beiden Präparate dienen in Kombination sowohl zur antiviralen Prophylaxe bei Transplantationspatienten, als auch als Therapie bei bestehender Erkrankung immungeschwächter Patienten. Eine Impfung steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung.

1.3 Struktur des Humanen Zytomegalievirus

1.3.1 Morphologie

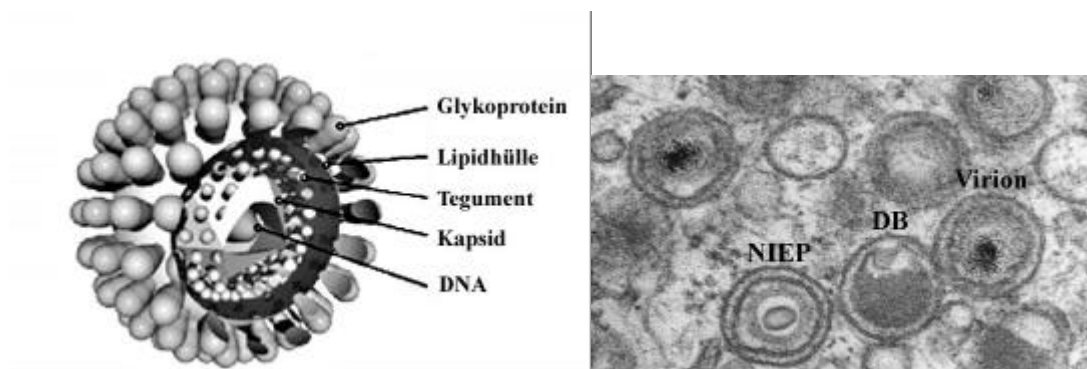


Abb.1: Schematische Darstellung des *humanen Zytomegalievirus* und elektronenmikroskopische Aufnahme reifer intrazellulärer umhüllter Virionen, nicht-infektiöser umhüllter Partikel (noninfectious enveloped particles, NIEPs) und „dense bodies“, (DB).

Das *humane Zytomegalievirus* hat eine für Herpesviren typische Struktur und besitzt ein Genom aus doppelsträngiger linearer DNA. Das Virus besteht aus einem DNA-haltigen Kern (core) in einem ikosaedrischen Kapsid von 100 nm Durchmesser. Das Kapsid ist umhüllt von einer elektronendichten Matrix oder Tegument (McGavran et al., 1965). Typisch für alle Herpesviren ist auch die lipidhaltige äußere Hülle (envelope) in der verschiedene, viral kodierte Glykoproteine eingelagert sind. So hat das reife *humane Zytomegalievirus* eine Größe von 150 bis 200 nm (Wright et al., 1964) (siehe Abbildung 1).

Elektronenmikroskopisch läßt sich das *humane Zytomegalievirus* nur schwer von anderen Viren der Herpesfamilie unterscheiden.

HCMV-infizierte humane Zellen setzen drei Typen von Partikeln frei. Zusätzlich zu den oben beschriebenen reifen, DNA-haltigen Viren (Virionen) gibt es die nicht infektiösen Partikel (noninfectious enveloped particles, NIEPs) und die sogenannten „dense bodies“, (Irmieri an Gibson, 1983). Die nicht infektiösen viralen Partikel unterscheiden sich morphologisch und biochemisch von Virionen nur dadurch, daß ihnen die elektronendichte DNA im Kapsid fehlt. Die "dense bodies" bestehen hingegen nur aus Tegumentproteinen, hauptsächlich pp65, und sind ebenfalls von einer Glykoprotein-haltigen Lipidmembran umgeben. "Dense bodies" werden in mit reifen Viruspartikeln vergleichbarer Menge freigesetzt. Weniger häufig werden die nichtinfektiösen umhüllten Viruspartikel (NIEPs) freigesetzt.

1.3.2 Genom

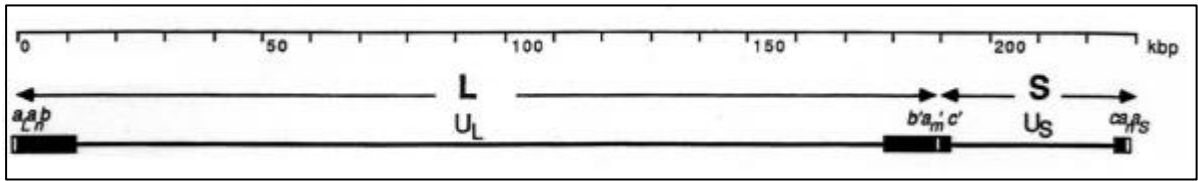


Abb.2: Schematische Darstellung des Genoms des *humanen Zytomegalievirus*. Typischer Aufbau der Genomstruktur der Gruppe E mit einer langen (L) und einer kurzen (S) Komponente und den flankierenden repetitiven Sequenzen a, b und c, sowie den invertierten repetitiven Sequenzen a', b' und c' zwischen L und S. Entsprechend ihrer Lokalisation sind die offenen Leserahmen mit UL oder US bezeichnet (B. Roizman, 1993).

Das *humane Zytomegalievirus* besitzt mit einer Größe von 240 kbp das größte Genom aller Herpesviren. Das Genom des HCMV-Stammes AD169 ist komplett sequenziert worden (Bankier et. al., 1991) und besitzt 208 vorhergesagte offene Leserahmen für Proteine, die mehr als 100 Aminosäuren besitzen (Chee et al., 1990). Die Herpesviren lassen sich außer durch ihre biologischen Eigenschaften auch aufgrund ihrer Genomstruktur in die unterschiedlichen Gruppen A bis F einteilen, was nicht mit der Einteilung in alpha-, beta- und gamma-Herpesviren korreliert. Das *humane Zytomegalievirus* gehört zur Gruppe E, die durch folgenden Genomaufbau charakterisiert ist (siehe Abbildung 2): Das Genom besteht aus einem langen (UL) und einem kurzen (US) nicht repetitiven Segment, die von den repetitiven Sequenzen a, b und c, die zwischen UL und US invertiert vorliegen, getrennt und flankiert werden. Zur gleichen Gruppe gehören noch die beiden Herpes simplex Viren 1 und 2.

Kürzlich wurden auch spezifische RNAs identifiziert, die mit dem *Zytomegalievirus* in die Wirtszelle gebracht werden. Hierbei handelt es sich um die Transkripte der offenen Leserahmen UL21.5, UL106-109, TRL/IRL 7 und TRL/IRL 13, wobei UL21.5 zu den spät (late) exprimierten Genen, UL106-109 zu den sehr frühen (immediate early) und TRL/IRL 7 und TRL/IRL 13 zu den früh (early) exprimierten Genen des *Zytomegalievirus* gehören. Die so in Form von RNA eingebrachten Gene können

unmittelbar nach Viruseintritt transkribiert werden. Die Funktion dieser Gene ist allerdings noch nicht bekannt (Bresnahan & Shenk, 2000).

1.3.3 Biochemie

Gereinigte Virionen vom *humanen Zytomegalievirus* bestehen aus mindestens 30 Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 200 kD. Zusätzlich findet man in gereinigten Virionen Serumproteine wie β_2 -Mikroglobulin und zelluläre Enzyme (Gibson, 1996).

Kapsid-Proteine

Es lassen sich vier unterschiedliche Kapside unterscheiden. Das reife, DNA-haltige Kapsid wird auch als C-Kapsid bezeichnet. Das PreB-Kapsid und das B-Kapsid sind DNA-lose Vorstufe und das A-Kapsid stellt vermutlich ein abortives Produkt der DNA-Verpackung dar (siehe 1.5.2 Kapsidmorphogenese).

Die Kapsid-Proteine des HCMV zeigen eine starke Homologie zum *Herpes Simplex Virus* Typ 1 (HSV-1), so daß man aufgrund der guten Kenntnis vom Aufbau des Kapsids des HSV-1 über Vergleiche der Gensequenz auf die offenen Leserahmen (ORF) des HCMV schließen kann. Die Kapsidstruktur aller Herpesviren gilt als stark konserviert.

Die äußere Hülle des Kapsids, die aus Kapsomeren aufgebaut ist, besteht aus vier unterschiedlichen Proteinen, dem "major capsid protein" (MCP), dem "minor capsid protein" (mCP), dem "smallest capsid protein" (SCP) und dem "mCP-binding protein" (mCP-BP).

Das Hauptprotein des Kapsids des HCMV ist das "major capsid protein" (MCP), codiert vom ORF UL86 und einer Größe von 1370 Aminosäuren. Ein weniger häufiges Kapsid-Protein ist das sogenannte "minor capsid protein", (mCP), daß vom ORF UL46 kodiert wird und vermutlich eine Rolle bei der Verankerung der viralen DNA im Kapsid spielt.

An der Reifung des Kapsids sind zwei weitere Proteine beteiligt, die ein Gerüst im Inneren bilden. Das Gerüst dient dem Aufbau der äußeren Hülle. Später in der Reifung wird dieses Gerüst, bestehend aus dem "assembly protein precursor" (UL80.5) und dem "proteinase

precursor" (UL80a), durch proteolytische Spaltung wieder abgebaut, wobei das "assembly protein" vollständig entfernt wird.

Der Vorgang der anschließenden Verpackung der Virus-DNA in die vorgeformten Kapside ist nicht genau bekannt, aber sehr wahrscheinlich von einem "cleavage/packaging" Enzym abhängig (Gibson, 1996).

Das B Kapsid des *humanen Zytomegalievirus* wurde mittels kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen dreidimensional mit einer Auflösung von 3.5 nm rekonstruiert. Es besteht aus 162 Kapsomeren, davon zwölf Pentamere und 150 Hexamere (Butcher et al., 1998).

Kürzlich wurde mit der gleichen Technik auch die dreidimensionale Struktur vom nukleären und von verschiedenen zytoplasmatischen B-Kapsiden des *Affen-Zytomegalievirus* (SCMV) mit einer Auflösung von ca. 2,2 nm aufgeklärt. Durch Vergleich von verschieden stark tegumentierten zytoplasmatischen B-Kapsiden mit nukleären B-Kapsiden konnten zwei mögliche Tegument-Bindungsstellen identifiziert werden (Trus et al., 1999).

Die Struktur intakter *humaner Zytomegalieviren* konnte ebenfalls dreidimensional aufgelöst werden, wobei die Bindungsstellen zwischen Kapsid und Tegument gezeigt werden konnten (Chen et al., 1999).

Tegument-Proteine

Das Tegument, oder Matrix genannt, das sich zwischen Kapsid und Virushülle befindet, besteht aus einer großen Zahl von insbesondere phosphorylierten Strukturproteinen. Die beiden Phosphoproteine pp150 (ppUL32) und pp65 (ppUL83) sind dabei die Hauptbestandteile des Teguments. Zudem sind diese beiden Proteine hoch immunogen. Im Vergleich zu anderen Herpesviren wird eine regulatorische Rolle in der viralen Genexpression und im Zellmetabolismus postuliert. So ist pp65, auch als "lower matrix protein" bezeichnet, ein Protein, welches in großen Mengen exprimiert wird und als Hauptakzeptor für Phosphorylierungen gilt, ein Protein, daß unmittelbar nach Infektion in den Zellkern transportiert wird. Die bereits erwähnten "dense bodies" bestehen zu ca. 95% aus pp65. Das andere bereits erwähnte Tegumentprotein, pp150 (ppUL32), auch "basic

phosphoprotein" genannt, macht etwa 20% der Masse eines Virions aus, und ist damit Hauptbestandteil des Virions. Es ist ebenfalls ein durch die virus-codierte Proteinkinase stark phosphoryliertes Protein (Mocarski, 1996).

Untersuchungen zeigten, daß pp150 (ppUL32) in der späten Phase der viralen Genexpression im Zellkern mit sich entwickelnden Nukleokapsiden assoziiert ist, und das bereits dort zumindest teilweise das Tegument des Virus an das Nukleokapsid anlagert wird (Hensel et al., 1995).

Ein weiteres Tegumentprotein, pp71 (ppUL82), ist als Transaktivator der Genexpression bekannt. Zusätzlich wurden zwei weitere Phosphoproteine im Tegument des HCMV identifiziert, pp28 (ppUL99), das in der Nähe der Kapsidoberfläche lokalisiert ist und hoch immunogen wirkt, sowie p130 (pUL56) (Bogner et al., 1993). Die offenen Leserahmen UL48 und UL49 bilden zusammen ein weiteres Tegumentprotein bzw. einen Komplex, in dem p212 (pUL48, high molekular-weight protein) von pUL47 (high-molekular-weight-protein-binding protein, 110kda) gebunden wird (Gibson, 1996).

Kürzlich wurde ein neues Strukturprotein, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Tegumentprotein handelt, charakterisiert. Dieses Protein, pUL25, zeigt eine Homologie zum Tegumentprotein pUL14 des humanen Herpesvirus 6, und spielt möglicherweise eine Rolle beim Umhüllungsprozess (Battista et al., 1999).

Proteine der Lipidhülle (envelope)

Die Lipidhülle des *humanen Zytomegalievirus* besteht aus wirtseigenen Lipiden und viralen Glykoproteinen. Das Hauptglykoprotein von HCMV ist gB (gpUL55), das wahrscheinlich am stärksten konserviert ist und ca. 50% der Glykoproteine der Lipidhülle ausmacht (Britt & Mach, 1996). Es besteht aus 906 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 150 kD. Das Protein wird proteolytisch gespalten, woraus ein 55 kD großes glykosyliertes carboxy-terminales und ein 93 kD großes amino-terminales glykosyliertes Fragment resultieren. Beide Fragmente bleiben als Heterodimer verbunden und werden in die virale Lipidhülle eingebaut. Sehr wahrscheinlich spielt das Protein eine Rolle bei der Penetration der Virionen in die Wirtszelle (Roizman & Sears, 1996), der Virustransmission von Zelle zu Zelle und der Fusion infizierter Zellen zu mehrkernigen

Riesenzellen (Tugizov et al., 1995). Virus-neutralisierende, gB-spezifische Antikörper können die Bindung der Viren an die Wirtszelle verhindern, was ein Hinweis darauf ist, daß gB eine Rolle bei der Infektion spielt (Ohizumi et al., 1992).

Ein weiteres, wichtiges virales Glykoprotein ist gH (gpUL75) mit einer Größe von 742 bis 743 Aminosäuren (je nach Stamm). Das nicht modifizierte Glykoprotein hat anfangs ein Molekulargewicht von 86 kD. Nach Modifizierungen im Golgi-Apparat mit Endoglykosidase-H-resistenten Zuckern besitzt es schließlich ein Molekulargewicht von 89 bis 125 kD. Als Glykoprotein in der Lipidhülle des Virus ist gH durch Disulfid-Brücken mit einem bisher unbekannten 145 kD viralen Protein komplexiert. Für den intrazellulären Transport und den Zusammenbau des Virus postuliert man eine kovalente Interaktion mit einem anderen viralen Protein, gL (gpUL115) (Kaye et al., 1992, Spaete et al., 1993). Man vermutet, daß gH die Membranfusion zwischen Virus und Wirtszelle vermittelt (Keay et al., 1991).

Ein drittes Glykoprotein in der Lipidhülle des *humanen Zytomeglievirus* ist gM (integral membrane protein, UL100). Es ist ein 372 Aminosäuren großes, nicht näher charakterisiertes Protein, das vermutlich Bestandteil des sogenannten gCII-Komplexes ist, ein Komplex aus verschiedenen Glykoproteinen mit Molekulargewichten von 47 bis 200 kD.

Eine Glykoproteinfamilie, die vom US-Segment des HCMV Genoms kodiert wird, besteht aus den ORF's US6, US7, US8, US9, US10 und US11. Bis auf gpUS10 und gpUS11 sind diese Glykoproteine am Aufbau des gCII-Komplexes beteiligt (Britt & Mach, 1996).

Die Glykoproteine gp48 (gpUL4) und gp65 sind weitere, nicht gut charakterisierte Bestandteile der viralen Lipidhülle (Britt & Mach, 1996).

1.4 Infektionszyklus und Morphogenese

1.4.1 Infektion

Die Infektion einer Zelle durch einen Virus beginnt mit der Anheftung des Virus an die Zelloberfläche und der anschließenden Penetration des Virus in die Zelle. Die Anheftung des *humanen Zytomegalievirus* an die Zelloberfläche wird über Heparansulfat vermittelt (Compton et. al., 1993). Als nächster Schritt folgt die spezifische Bindung des Virus an die Zelloberfläche. Für die spezifische rezeptorvermittelte Bindung des *humanen Zytomegalievirus* wurden auf zellulärer Seite zwei Membranproteine identifiziert, ein 92 kD großes (Keay et. al. 1989) und ein 30 kD großes Membranprotein (Taylor & Cooper, 1990), die von den viralen Glykoproteinen gB und gH erkannt werden. Der anschließende Penetrationsprozess geschieht durch pH-unabhängige Fusion zwischen Zellmembran und Virushülle (Compton et. al., 1992). Man nimmt an, daß das virale Glykoprotein gB mit einer fusigenen Domäne an der Membranfusion beteiligt ist (Bold et. al., 1996).

Durch die Membranfusion und Penetration verliert das Virus die Lipidhülle.

Anschließend folgt der Transport der penetrierten Nukleokapside in den Zellkern. Für HSV-1 ist bekannt, daß die Nukleokapside mit Hilfe von Dynein über Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert werden, um dort ihre DNA in den Zellkern zu schleusen (Sodeik et. al., 1997).

Die Transkription und Replikation der viralen DNA geschieht im Zellkern.

1.4.2 Kapsidmorphogenese

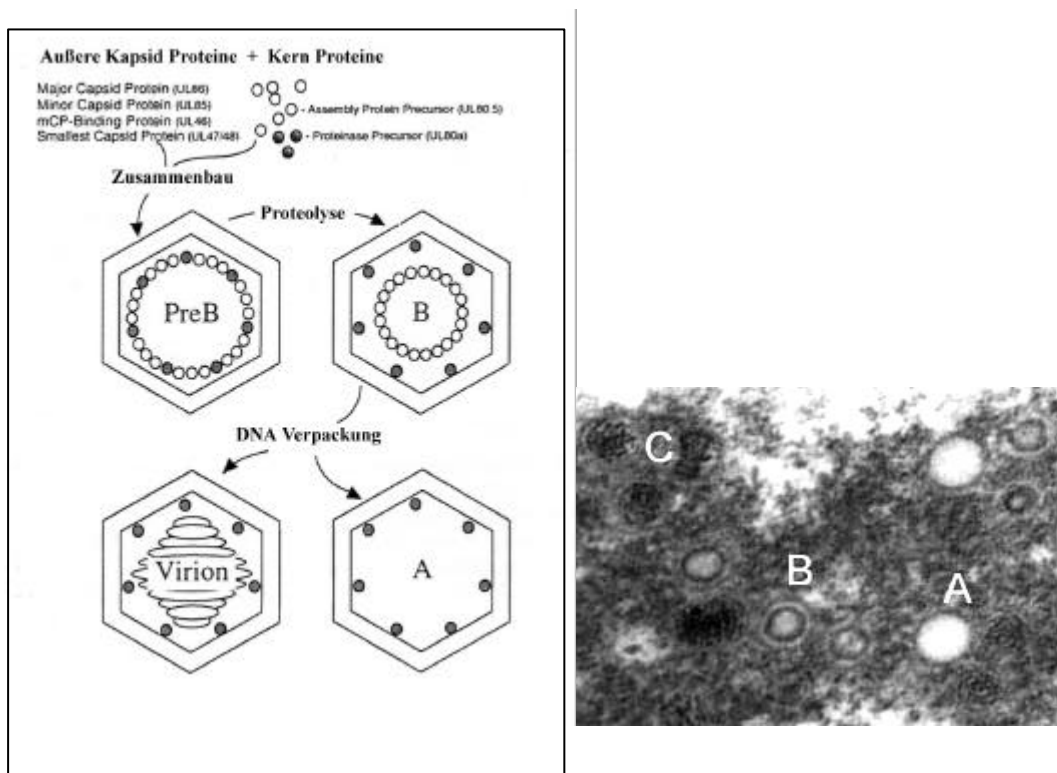


Abb.3: Modell der Kapsidreifung von Herpesviren. Durch proteolytische Spaltung der Kern-Proteine (Assembly Protein Precursor (pAP), Proteinase Precursor) entsteht aus dem preB-Kapsid durch Konformationsänderungen das B-Kapsid. Durch Einbau von viraler DNA entstehen reife Nukleokapside (C-Kapside). A-Kapside stellen vermutlich abortive Produkte der DNA-Verpackung dar (Gibson, 1996). Die elektronenmikroskopische Abbildung zeigt den Zellkern einer infizierten Zelle mit leeren A-Kapsiden (A), B-Kapsiden (B) und DNA-haltigen, reifen Nukleokapsiden (C).

Der Zusammenbau der Kapside geschieht im Zellkern. Dafür müssen die Kapsidproteine in den Zellkern gelangen. Bis auf das "major capsid protein" MCP sind alle äußeren Kapsidproteine klein genug, um durch Diffusion den Zellkern zu erreichen. Da MCP keine Signalsequenz für den Transport durch die Kernporen besitzt, komplexiert es im Zytoplasma an ein Kapsidprotein (Assembly Protein Precursor, pAP) welches diese Signalsequenz besitzt und somit als Komplex in den Zellkern transportiert wird.

Es lassen sich vier unterschiedliche Kapside unterscheiden: Das PreB-Kapsid stellt die früheste Vorstufe der Kapsidmorphogenese dar und besteht aus einer äußeren Kapsidhülle und einem inneren Kern. Die Hülle entsteht durch die Interaktion aller vier äußeren Kapsidproteine (MCP, mCP, mCP-BP, SCP). Der Kern besteht aus den beiden Kernproteinen (pAP und "proteinase precursor"), die ein Gerüst zum Aufbau der Kapsidhülle bilden (Abbildung 3).

Durch Spaltung der Kernproteine kommt es anschließend zu einer Umordnung der Kernproteine, woraus das B-Kapsid resultiert.

Im darauf folgenden Schritt des Reifungsprozesses wird das gespaltene pAP aus dem Kapsid entfernt und die DNA im Kapsid verpackt. Diese reifen, DNA-haltigen Kapside werden auch als C-Kapside bezeichnet.

Die A-Kapside entstehen wahrscheinlich durch eine fehlerhafte Verpackung der DNA (Gibson, 1996).

1.4.3 Transport- und Reifungsknospung

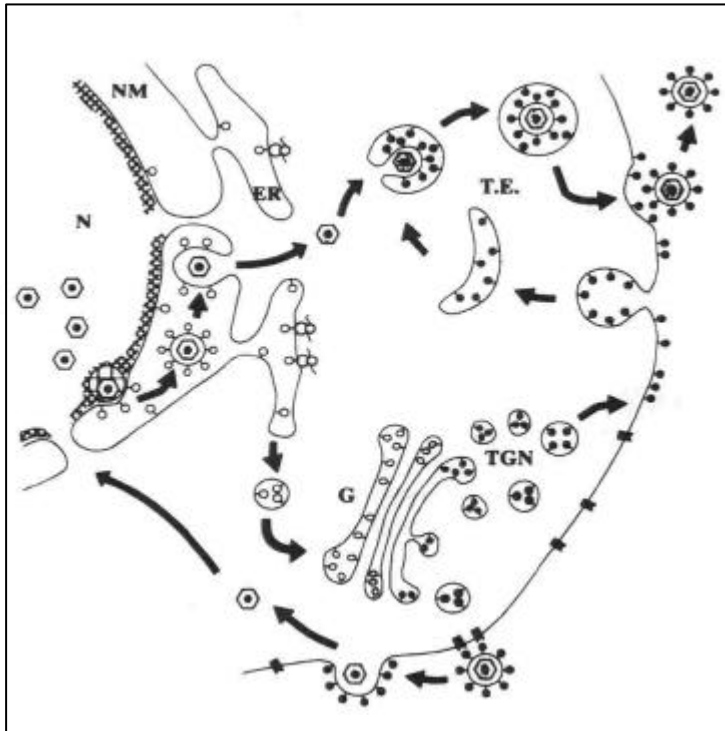


Abb.4: Schematische Darstellung der Transport- und Reifungsknospung von HCMV. Nukleus (N), Kernmembran (NM), endoplasmatisches Retikulum (ER) mit unreifen Glykoproteinen (weiß), Golgi-Komplex (G), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) mit reifen Glykoproteinen (schwarz), frühes tubuläres Endosom (TE). (Radsak et al., 1995)

Die reifen Nukleokapside müssen nun zur weiteren Reifung den Zellkern verlassen, um im Zytoplasma das restliche Tegument und die Virushülle zu erhalten (Abbildung 4). Hierzu lagern sich die Nukleokapside an die Kernlamina an. Man postuliert eine virale Phosphatase, die die Kernlamina fokal auflockert, indem die Lamine A und C dephosphoryliert werden (Radsak et al., 1991). Einem Modell zur Reifungs- und Transportknospung zur Folge (Radsak et al., 1995), treten die Nukleokapside durch die Kernlamina und gelangen in den perinukleären Raum. Hierzu ist die Anwesenheit von viralen Glykoproteinen in der inneren Kernmembran, die vermutlich durch laterale Diffusion über die Kernporen dorthin gelangen, notwendig. Indem die Nukleokapside in den perinukleären Raum knospen, erhalten sie ihre vorläufige Membran mit unreifen viralen Glykoproteinen. Im weiteren müssen die Nukleokapside den perinukleären Raum wieder

verlassen, wobei sie bei dieser Knospung in das Zytoplasma ihre Membran wieder verlieren und als nackte Nukleokapside im Zytoplasma vorliegen. Die nun folgende Reifungsknospung geschieht an membranösen Kompartimenten in der Nähe des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) und des Mikrotubuli organisierenden Zentrums (MTOC). Experimente mit dem Flüssigphase Marker Meerettich-Peroxidase haben gezeigt, daß an der Umhüllung das frühe tubuläre Endosom beteiligt ist (Tooze, 1993). Behandelt man Zellen, die mit HCMV infiziert sind, mit Brefeldin A (BFA), so führt dies zur Auflösung des Golgiapparates, nicht aber des tubulären Endosoms, wobei der Prozeß der Virusumhüllung unbeeinflusst bleibt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das tubuläre Endosom ein eigenständiges Kompartiment ist und an der Umhüllung der Nukleokapside beteiligt ist.

Die viralen Glykoproteine werden hingegen in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert und gelangen auf die Zelloberfläche. Von dort werden sie wieder internalisiert, um im frühen tubulären Endosom an der Reifungsknospung teilzunehmen (Radsak, 1995). Im frühen Endosom werden die zytoplasmatischen Virionen, die vom Tegument umgeben sind, mit einer Membran umhüllt, die virale Glykoproteine besitzt. Man postuliert, daß es bei diesem Prozeß eine Interaktion zwischen Tegument und Glycoprotein gibt (Stinski, 1976). Die Reifungsknospung führt zu Viruspartikeln mit einer Doppelmembran. Durch Fusion der äußeren Membran des Virions mit der Zellmembran werden die reifen Viren freigesetzt, die jetzt nur noch eine einfache Hülle besitzen.

Der Ort der Tegumentation ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Da aber viele Tegumentproteine im Zellkern nachgewiesen werden können, nimmt man an, daß die Nukleokapside zumindest bereits teilweise im Zellkern das Tegument erhalten.

Andere neuere Untersuchungen deuten durch Kolo-kalisation vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) Marker TGN 46 und dem viralen Tegument-Protein pp150 auf eine Mitbeteiligung des Trans-Golgi-Netzwerkes an der Umhüllung und Tegumentation hin (Sanchez et al., 2000).

1.5 DNA-Replikation und Genexpression des humanen Zytomegalievirus (nach Mokarski, 1996)

Typisch für die Replikation von Herpesvirus-DNA ist der sogenannte "rolling-circle". Hierbei wird die lineare Virus-DNA unmittelbar nach Freisetzung durch Fusion der Enden ringförmig. Anschließend wird die ringförmige Virus-DNA abgelesen und es entsteht concatemerische DNA, also kettenförmig aneinander gereihete Virus-Genome. Diese concatemerische DNA wird anschließend in einzelne Virus-Genome gespalten und in Kapside verpackt. Der Mechanismus der Zirkularisierung und Spaltung der concatemerischen DNA sind weitgehend unbekannt (McVoy et al., 1994).

Der vollständige Replikationszyklus des *humanen Zytomegalievirus* dauert länger als der des *Herpes Simplex Virus*. Die ersten reifen Viren werden 72 Stunden nach der Infektion freigesetzt. Die Abfolge der Genexpression viraler Gene lässt sich dabei in drei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen unterteilen: α –(unmittelbar früh, immediate early), β –(verzögert früh, delayed early) und γ –(spät,late) Phase.

α -Phase (immediate early, IE)

Aufgabe der Genprodukte der α -Phase ist die positive und negative Regulation der viralen Genexpression. Man unterscheidet zwei Hauptgene, MIE (major immediate-early) und IEU3. MIE kodiert für zwei Proteine, IE1 und IE2, welche durch unterschiedliches Spleißen aus fünf Exons gebildet werden. Kürzlich wurden noch zwei weitere IE-Proteine identifiziert, die ein etwas größeres Molekulargewicht haben und von MIE codiert werden, p91, homolog zu IE1 und p102, homolog zu IE2. Reguliert wird der MIE Promoter (MIEP) durch zahlreiche Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, die an stromaufwärts liegende Enhancer- und Repressor-Elemente binden. In undifferenzierten Zellen überwiegen vermutlich die zellulären Proteine, die an Repressoren binden und somit die Virusreplikation hemmen.

Zusätzlich zu den zellulären Transkriptionsfaktoren wurden zwei virale Proteine identifiziert, UL82 (pp71) und UL69, die die Transkription der MIE-Proteine direkt oder indirekt

aktivieren. Hierzu ist keine *de novo* Synthese dieser Proteine notwendig, da sie, als Bestandteil des Teguments, mit dem Virus in die Zelle eindringen.

Das Eindringen des Virus allein führt bereits zur Auslösung einer Signaltransduktion, die die Promotoren für *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* aktiviert (Boldogh et al., 1990).

IE1 ist ein phosphoryliertes Protein mit einer Molekularmasse von 68 bis 72 kD; IE2 ist ein ebenfalls phosphoryliertes Protein mit einer Molekularmasse von 80 bis 86 kD. Beide Proteine akkumulieren nach Infektion mit HCMV im Zellkern. Zusätzlich gibt es zwei weitere, quantitativ geringere IE2-Proteine, die durch alternatives Spleißen gebildet werden. Bereits 20 bis 30 Minuten nach Infektion mit HCMV können diese Proteine nachgewiesen werden und sind auch spät in der Infektion noch vorhanden. Die Expression von IE1 und IE2 steht unter der Kontrolle eines starken Enhancers (CMV enhancer) mit zahlreichen Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsaktivatoren und einer Bindungsstelle für das als Transaktivator bekannte virale Protein pp71. Der Enhancer wird zusätzlich autoregulatorisch durch IE1 und IE2 aktiviert.

Weitere α -Genprodukte sind UL36, UL37, TRS1, IRS1 aus der US22-Familie und US3.

β -Phase (delayed early)

Die β -Phase lässt sich in β_1 - und β_2 -Phase unterteilen. Die β_1 -Phase der Genexpression ist der Zeitraum von vier bis acht Stunden nach der Infektion. Die β_2 -Phase schließt sich an und endet 24 Stunden nach Infektion. Die β -Phase ist gekennzeichnet durch eine Unabhängigkeit von der viralen DNA-Replikation, benötigt jedoch die Synthese von α -Genprodukten. Die Transkripte der β_2 -Phase sind an der DNA-Replikation und dem Nukleotid-Stoffwechsel beteiligt.

Generell steht in der β -Phase der Virusvermehrung die Synthese von Proteinen zur DNA-Replikation im Vordergrund. An der Replikation der Virus-DNA sind mindestens sechs unterschiedliche Proteine beteiligt. Die DNA-Polymerase besteht aus zwei Proteinen, die von UL44 und UL54 codiert werden, wobei UL54 das Hauptprotein ist, und UL44 mit UL54 assoziiert ist und die virale DNA-Polymerase stimuliert.

Weitere Proteine der viralen DNA-Replikation bilden die Helicase-Primase, ein Proteinkomplex, der aus den drei Untereinheiten UL105, UL102 und UL70 besteht (Roizman, 1993).

gPhase (late)

Auch diese Phase wird in zwei Klassen unterteilt. Die γ_1 -Phase umfaßt den Zeitraum 24 bis 36 Stunden nach Infektion. Durch Hemmung der DNA-Replikation ist in dieser Phase die Menge der Genprodukte erniedrigt.

Die γ_2 -Phase, die sich bis 48 Stunden nach Infektion erstreckt, ist obligat von der DNA-Replikation abhängig.

Die γ -Phase der Virusreplikation dient in erster Linie der Synthese von viralen Strukturproteinen wie Kapsid-, Tegument- und Glykoproteinen.

1.6 In vitro Zellsysteme und Permissivität

Das humane Zytomegalievirus kann jedes Organ des menschlichen Körpers befallen, denn zu den Zielzellen einer Infektion zählen die in allen Organen vorkommenden Epithel- und Endothelzellen. Daneben zählen die glatten Muskelzellen zu den primären Infektionsorten. Lange Zeit ging man davon aus, daß Fibroblasten bzw. Fibrozyten nicht zu den Zielzellen einer Infektion zählen, jedoch weiß man heute, daß auch die Fibroblasten primär infiziert werden (Sinzger et al. 1995).

In vitro sind eine Reihe primärer Zellkulturen für HCMV permissiv. Dazu zählen die ebenfalls *in vivo* infizierbaren Endothel- und Epithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Makrophagen. Weiterhin sind neuronale Zellen *in vitro* permissiv für HCMV. Zahlreiche Untersuchungen, bei denen die Virusreplikation *in vitro* in epithelialen Schilddrüsenzellen (Knowles 1976), Kapillarendothelzellen des Gehirns (Lathey et al.

1990) und glattmuskulären Zellen der Arterienwand (Tumilowicz et al. 1985) nachgewiesen wurden, haben dies gezeigt..

Von besonderer Bedeutung sind hier Fibroblasten, die *in vitro* sehr gut mit HCMV infizierbar sind und durch sehr hohe Virusproduktion eines der wichtigsten *in vitro* Zellsysteme zum Studium der viralen Genexpression und Virusmorphogenese darstellt.

Obwohl das *humane Zytomegalievirus* sehr speziesspezifisch ist, ist die Infektion von Schimpansen-Hautfibroblasten in primären Zellkulturen möglich. Dies beschränkt sich jedoch auf Infektionen mit dem HCMV Laborstamm Town. Dieses Virus zeigt eine schwache Replikation in dieser speziessfremden primären Zellkultur (Perot et al., 1992).

Neben den erwähnten primären Zellkulturen wurden eine Reihe von Zelllinien beschrieben, die für HCMV permissiv sind.

Hierzu zählt Oligodendrogliom Zelllinie (HOG), unreife Tumorzellen, die, wenn sie durch Behandlung mit verschiedenen Substanzen zu reiferen Zellen differenzieren, voll permissiv sind, aber nur eine geringe Virusproduktion aufweisen (Spiller et al., 1997).

Eine aus einer Amniozentese gewonnene epitheloide Zelllinie (BAMB) ist ebenfalls permissiv für HCMV, allerdings auch mit einer geringeren Virusproduktion als primäre Fibroblasten (Vonka et al., 1967).

Ogura et al. (1986) hat verschiedene Zelllinien des Zentralnervensystems bezüglich der Permissivität untersucht. Die beiden Zelllinien 118MGC, eine Glioblastom Zelllinie, und IMR-32, eine Neuroblastom Zelllinie, erwiesen sich als permissiv, wenn man sie mit einer hohen Virusdosis infiziert. Die Oligodendrogliom Zelllinie KGC hingegen ist nicht permissiv. Humane Teratokarzinomzellen sind für HCMV nicht permissiv, lassen sich aber mit Retinsäure differenzieren und werden somit permissiv (Gönczöl et al. 1984, LaFemina, 1986).

Man hat auch humane Fibroblasten immortalisiert, indem man sie mit den beiden Genen E6 und E7 des *humanen Papillomavirus* transfiziert hat. Die Permissivität blieb dabei erhalten und der Virustiter war sogar höher als bei primären Fibroblasten (Compton, 1993).

Von größter Bedeutung für bestimmte Experimente ist jedoch die humane Astrozytom-Zelllinie U373-MG.

Als Voraussetzung für die Permissivität von Zelllinien ist im Gegensatz zu primären Zellkulturen weniger der Phänotyp bzw. die Abstammung, sondern vielmehr der Grad der Ploidie und der Differenzierung entscheidend. So ist die aneuploide Fibroblasten-Zelllinie HT-144 nicht permissiv, die diploide epitheliale Zelllinie HCMC hingegen ist permissiv (Smith, 1986).

1.7 HCMV und Zellzyklus

Um optimale Bedingungen zur Replikation der viralen DNA zu schaffen, wird der Zellzyklus infizierter Zellen von HCMV beeinflusst. Durch Aktivierung und Hemmung verschiedener Regulatoren des Zellzyklus wird die DNA-Synthese in der Wirtszelle inhibiert. Die Wirtszelle wird in der späten G1 oder frühen S-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Infektion mit HCMV führt zur Induktion von Cyclin E in der Wirtszelle und damit zur Aktivierung von Cdk2. Zusätzlich erfolgt eine Inhibition der Cdk2-Inhibitoren Cip1 und Kip1. Diese Aktivierung überführt die durch Serumentzug in der G0-Phase arretierte Zelle in die späte G1-Phase des Zellzyklus.

Weder Cyclin A, das den Übergang von der S-Phase zur G2-Phase reguliert, noch Cyclin D, das den Übergang in die S-Phase steuert, wird durch Infektion aktiviert (Bresnahan et al., 1996).

Andere Herpesviren verursachen ebenfalls Blockierungen des Zellzyklus. Die Arretierung des Zellzyklus durch virale Proteine erfolgt ebenfalls bei den anderen Mitgliedern der Familie der Herpesviren. So ist beim *Herpes simplex Virus* das ICP27, beim HBV das immediate-early Protein BZLF1 in diesen Prozeß involviert.

Kürzlich hat man ein virales Protein, das für die Zellzyklus-Arretierung HCMV-infizierter Zellen verantwortlich ist, identifiziert. Hierbei handelt es sich um das Tegumentprotein UL69. So kann das Protein direkt nach Infektion wirksam werden, es muß also nicht erst synthetisiert werden. Auch UV-inaktivierte Viren führen alleine durch virale Proteine, die durch eine Infektion in die Zelle eingebracht werden, zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Mansuo, 1998).

Das ubiquitäre Phänomen der Zellzyklus-Arretierung durch Herpesviren spricht für die Notwendigkeit dieses Prozesses in Hinsicht auf die Virusreplikation.

Eine Infektion von Zellen vor oder in der S-Phase des Zellzyklus führt zunächst nicht zu einem Arrest, sondern die infizierten Zellen vollziehen zuerst die S-Phase und Mitose, bevor die Zelle in der G1-Phase arretiert werden. Dies führt zu einer Verzögerung sowohl des zytopathischen Effektes als auch der Synthese der immediate-early und early Proteine (Salvant et al., 1998).

1.8 Morphologische Veränderungen in HCMV-infizierten Zellen

Im Laufe des viralen Replikationszyklus verändert sich die Wirtszelle, in dem sie den sogenannte zytopathischen Effekt ausbildet. Mit einer Vergrößerung der infizierten Zelle (Zytomegalie) sind zahlreiche ultrastrukturelle Veränderungen verbunden, die sich zum einen auf den vom Virus induzierten gesteigerten Metabolismus der Wirtszelle zurückführen lassen, und zum anderen auch direkte Ursache der Virusreplikation sind. Es finden sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma Veränderungen statt. Schon lichtmikroskopisch läßt sich erkennen, daß die infizierte Zelle deutlich vergrößert ist. Einschußkörperchen findet man sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Wegen der lichtmikroskopisch sichtbaren nukleären Einschußkörperchen spricht man auch von "Eulenaugenzellen".

Schon in der ersten Stunde des Replikationszyklus läßt sich in humanen embryonalen Fibroblasten eine Depolymerisation von Mikrofilamenten nachweisen, wobei Mikrotubuli und intermediäre Filamente auch spät im Replikationszyklus unverändert bleiben (Arcangeletti et al., 2000).

Diese Veränderungen der infizierten Zellen wurden von Severi et al. (1992) ultrastrukturell untersucht. Im Zellkern befinden sich neben einem vergrößerten Nukleolus sogenannte elektronendichte nukleäre "dense bodies", die scheinbar aus dem Nukleolus hervorgehen. Diese nukleären "dense bodies" bestehen unter anderem aus zellulären Proteinen, viralen Proteinen wie pp65, DNA und RNA.

Später im Replikationszyklus entsteht eine weniger elektronendichte, retikuläre, granuläre Struktur, "Skein" genannt, in der sich zahlreiche sich entwickelnde Nukleokapside befinden. In diese Struktur sind die nukleären "dense bodies", die auch mit Nukleokapsiden assoziiert sind, oft eingelagert. Das Skein kann über den ganzen Zellkern verteilt sein.

Im Zytoplasma infizierter Zellen findet man neben vielen multivesikulären Lysosomen auch einen hypertrophischen Golgi-Komplex, der sich später um das Zentriol anordnet und als "Viroplasma" bezeichnet wird (siehe Abbildung 5).

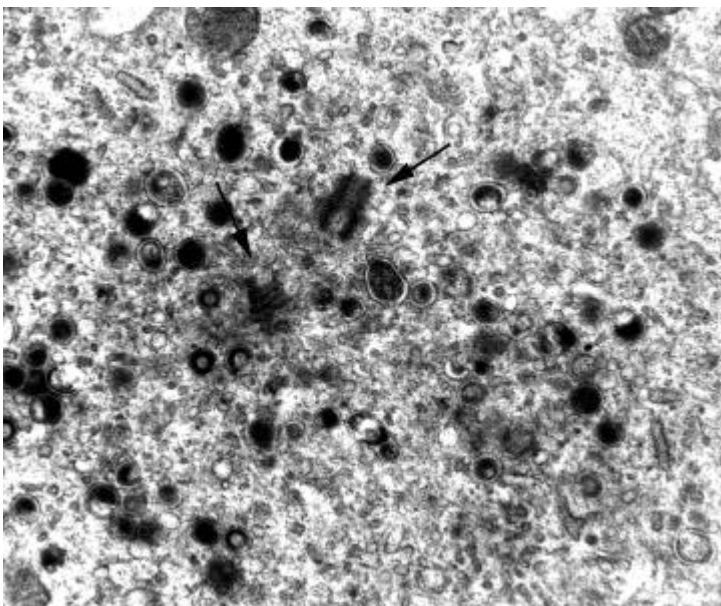


Abb.5: Diese elektronenmikroskopische Abbildung zeigt das Zytoplasma eines HCMV-infizierten humanen Fibroblasten drei Tage nach Infektion. Die Pfeile deuten auf die Zentriolen, um die sich das "Viroplasma" anordnet.

Die während der Replikation entstehenden zytoplasmatischen "dense bodies" bestehen ebenso wie die nukleären "dense bodies" aus elektronendichtem Material und sind oft von einer vom Golgi-Komplex stammenden Membran umhüllt und bestehen ebenso wie die nukleären "dense bodies" unter anderem aus pp65, DNA und RNA.

Einige zytoplasmatische "dense bodies" befinden sich direkt an der Kernmembran und scheinen pp65 durch Kernporen in den Zellkern zu injizieren.

Die meisten zytoplasmatischen "dense bodies" werden in Vesikel verpackt, deren Ursprung der Golgi-Apparat ist. Sie können aber auch untereinander oder mit anderen zytoplasmatischen Strukturen zu sogenannten "black holes" fusionieren oder die Zelle verlassen.

Diese "black holes" entstehen durch Akkumulation von elektronendichtem, granulären Material, welches pp65 positiv ist. In diesen Strukturen scheinen nackte Kapside, umhüllte Partikel, "dense bodies" und primäre und sekundäre Lysosomen zu fusionieren (Severi et al. 1988).

Die Funktion dieser Strukturen ist bis heute nicht geklärt. Man nimmt an, dass die intranukleären Strukturen wie das Skein und die nukleären "dense bodies" lediglich Ausdruck der Stimulation des zellulären Metabolismus sind, während die zytoplasmatischen "dense bodies" als Speicher für die im Überfluß produzierten zellulären und viralen Proteine dienen, um dann abgebaut zu werden (Severi et al., 1991).

Andere halten diese intranukleären Strukturen, da sie DNA und virale Strukturproteine enthalten, für den Ort der Nukleokapsidreifung (Mokarski, 1996).

1.9 Fragestellung der Arbeit

Für die meisten Untersuchungen bezüglich der Replikation von HCMV oder der Virus-Wirt-Interaktion spielen humane Fibroblasten eine bedeutende Rolle, da sie sehr gut infizierbar sind und sehr große Mengen an reifen Viren produzieren und freisetzen. Für Untersuchungen, die stabile Transfektionen erfordern, wie zum Beispiel die Transfektion von Antisense-Vektoren zur gezielten Inhibition viraler mRNA, die Transfektion viraler Gene zur Untersuchung der Genexpression, oder die Herstellung einer HCMV-Deletionsmutante sind primäre Fibroblasten aufgrund ihrer kurzen Haltbarkeit von ca. 25 Passagen nicht geeignet für stabile Transfektionen. Ein Beispiel für eine Deletionsmutante ist ein pp65-defizienter HCMV (Schmolke et al., 1995). Antisense-Experimente wurden zur Inaktivierung der pp150-mRNA durchgeführt (Meyer et al., 1997). Zusätzlich gibt es eine Reihe von Experimenten mit der Herstellung von stabilen Transfektionen zur Untersuchung der Genprodukte, wie z.B. Untersuchungen zur Expression vom viralen Glykoprotein gB (Reis et al., 1993).

Dies war auch der Hintergrund für die Herstellung immortalisierter humaner Fibroblasten (Compton, 1993). Aber auch diese immortalisierten Fibroblasten haben keine unbegrenzte

Lebensdauer und haben sich für diese Art der Experimente mit stabilen Transfektionen nicht etabliert.

Aus diesem Grund ist man zur Herstellung stabiler Transfektionen auf humane Zelllinien angewiesen, die permissiv für HCMV sind und für stabile Transfektionen geeignet sind. Als eine permissive Zelllinie hat sich die Astrozytoma-Zelllinie U373-MG bei Transfektions-Experimenten etabliert.

Mehrere Arbeiten zeigen jedoch, daß die Astrozytoma-Zelllinie U373-MG zwar für HCMV permissiv ist, die Virusreplikation bzw. Freisetzung von Viruspartikeln stark vermindert ist (Kari et al., 1992).

Ziel der Arbeit war es, die Astrozytoma-Zelllinie U373-MG bezüglich der HCMV Replikation zu charakterisieren und die Ursachen der geringen Virusfreisetzung zu untersuchen.

Hierfür wurde die Proteinsynthese der unterschiedlichen, nacheinander ablaufenden Phasen der Virusreplikation mit dem Ziel untersucht, Blockaden zwischen den unterschiedlichen Phasen der Replikation zu erkennen.

Dazu wurden Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt, um gleichzeitig Proteine der IE-Phase (α -Phase) und Proteine der späten Phase (γ -Phase) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion nachzuweisen. Dadurch konnte bestimmt werden, wie viele Zellen sich in welcher Phase der Virusreplikation befinden.

Die Titerbestimmung diente als Maß für die Virusfreisetzung.

Mit der Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde die Virusmorphogenese in HCMV-infizierten Zellen untersucht, um Hinweise auf defekte Reifungsprozesse zu erhalten.

Die Untersuchungen wurden vergleichend mit humanen Fibroblasten durchgeführt.

2 Material

2.1 Geräte

Zellkultur:

CO₂-begasbarer Brutschrank Modell B5060 EC (Firma Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Modell Z364

Optische Geräte:

Fluoreszenzmikroskop Diaplan mit Kamera (Leitz, Wetzlar)

Konfokales Laserscanning-Mikroskop Leica TCS

Inverses Lichtmikroskop Wilovert S mit Kamera (Hund, Wetzlar)

Sonstige:

Magnetrührer Modell IKA-Combimag RCH (IKA Labortechnik, Staufen)

pH-Meter Modell pH 522 (WTW, Weilheim)

Waage Modell 1219 MP (Satorius, Göttingen)

Feinwaage Modell H10T (Mettler, Schweiz)

Pipetten der Firmen Abimed, Düsseldorf und Eppendorf, Hamburg

Autoklav (Lautenschläger, München)

Wärmeblock Modell Dri-Block DB-1 (Techne, Dextford-Cambridge, England)

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

2.3 Mediengrundstoffe

Eagle's MEM, nicht-essentielle Aminosäuren (100x), Vitamine (100x) mit für die Kultivierung der humanen Fibroblasten (Gibco/BRL, Eggenstein)

DMEM (Gibco) mit Zusatz von HEPES (Serva, Hamburg) für die Kultivierung der Astrozytom-Zelllinie U373-MG

FKS, fetales Kälberserum (Seromed, Berlin)

2.4 Antibiotika

Penicillin G (Seromed, Berlin)

Streptomycin Sulfat (Seromed, Berlin)

Das verwendete Wasser wurde durch das Milli-Q-Water-System aufgereinigt.

2.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

PBS (phosphate buffered saline):

140 mM NaCl

6,5 mM Na₂HPO₄

2,5 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

pH 7,25

2.6 Verwendete Antikörper

PAb XP1, Anti-pp150-Fusionsprotein (beta-Galaktosidase-pp150 As 555-705) vom Kaninchen. (Behringwerke, Marburg, Scholl et al., 1988)

MAb 27-156, anti-gB (gpUL55) von der Maus (Spaete et al., 1994), freundlicherweise von Prof. Britt (Birmingham, Alabama, USA) zur Verfügung gestellt.

MAb BS510, anti-pp52 (ppUL44) von der Maus (Plachter et al., 1992), freundlicherweise von Prof. Plachter, Mainz, zur Verfügung gestellt.

BGE1, anti-pp65-Fusionsprotein (Gluthation-S-Transferase-pp65 As 325-511) vom Kaninchen. (Hensel et al., 1995)

Anti-CMV, early nuclear protein (IgG2a) von der Maus (Dupont, Wilmington, USA)

Anti-CMV IE1 und IE2 Antikörper HA 3.551 von der Maus.

Rhodamin-konjugierte Anti-Kaninchen F(ab')-Fragmente (Dianova, Hamburg)

Fluoreszin-Konjugierte Anti-Kaninchen F(ab')-Fragmente (Dianova, Hamburg)

Texas-Red-konjugierte Anti-Maus F(ab')-Fragmente (Dianova, Hamburg)

TRITC-konjugiertes Anti-Maus-IgG vom Kaninchen (Dako, Hamburg)

Merettich-Peroxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper von der Ziege (Biorad, München)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die humanen Vorhautfibroblasten (HFF, human foreskin fibroblasts) stammen von Zirkumzisionen und wurden freundlicherweise von Prof. Radsak zur Verfügung gestellt. Für experimentelle Zwecke wurden Zellen zwischen der 10. und 25. Passage verwendet. Die Fibroblasten wurden für Virustitrationen, zur Vermehrung der Viren und zum direkten Vergleich mit Astrozytom-Zellen verwendet.

Die Astrozytom-Zelllinie U373-MG (ATCC HTB17) wurde freundlicherweise von Prof. Radsak zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Medien und Lösungen

Kultivierung der humanen Fibroblasten

Fibroblasten-Kulturmedium (MEM/10% FKS):

- 9,5 g/l Eagle's MEM (Gibco/BRL)
- 100 ml/l FKS (Seromed, Berlin)
- 10 ml/l MEM Vitamin-Lösung (100x) (Gibco/BRL)
- 10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren (100x) (Gibco/BRL)
- 2,2 g/l NaHCO₃
- 100000 IE/l Penicillin G
- 10 mg/l Streptomycin-Sulfat
- pH 7,3

Kultivierung der Astrozytom-Zelllinie U373-MG:

U373-MG Kulturmedium (DMEM/10% FKS):

13,4 g/l Dulbecco's MEM (Gibco/BRL)
100 ml/l FKS (Seromed, Berlin)
3,7 g/l NaHCO₃
6 g/l (25 mM) HEPES (Serva, Heidelberg)
100000 IE/l Penicillin G
10 mg/l Streptomycin-Sulfat
pH 7,1

Die Medien wurden steril filtriert. FKS, die nicht-essentiellen Aminosäuren und die Vitaminlösung wurden anschließend zugegeben.

Trypsin/EGTA-Lösung:

0,25 % Trypsin (w/v) (Seromed, Berlin)
5 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) (Sigma,
Deisenhofen)
in PBS pH 7,4

3.1.2 Kultivierung

Die Züchtung der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit einer 5%-CO₂-Atmosphäre. Als Kulturgefäße dienten Plastik-Flaschen oder Plastik-Schalen (Fa. Greiner, Frickenhausen oder Fa. Costar, Cambridge, USA). Einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert, die Fibroblasten wurden im Verhältnis 1:5 verdünnt, die U373-MG-Zelllinie je nach Bedarf zwischen 1:5 und 1:10. Zur Passagierung wurden die konfluent gewachsenen Zellen zuerst zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EGTA behandelt, bis sich die Zellen vollständig vom Boden des Kulturgefäßes gelöst haben. Dann wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium (37°C) aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend

entsprechend verdünnt in die Kulurflaschen verteilt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen in Kulturmedium (Fibroblasten in MEM und U373-MG in DMEM) mit 40% FKS und 10% Dimethylsulfoxyd (DMSO) gegeben, in entsprechende Einfrierröhrchen (Fa. Costar, Cambridge, USA) abgefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2 Zellbiologische und virologische Methoden

3.2.1 Virus-Stamm

Alle Experimente wurden mit dem HCMV-Laborstamm Ad169 durchgeführt.

3.2.2 Herstellung eines Virusstocks

Konfluent gewachsene humane Fibroblasten wurden in MEM mit 2% FCS gehalten. In das Kulturmedium wurden zur Infektion Viren mit einer Dosis von 0,1 Virus pro Zelle gegeben. Nach ca. 10 Tagen zeigen alle Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt. Das Medium wurde entnommen, 10 Min. bei 1000g zentrifugiert, um Zellbestandteile zu sedimentieren, und der Überstand anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.3 Virustitration

Der Virustiter wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Die absolute Menge infektiöser Partikel wurde mit dem Plaque-Assay (Wentworth and French, 1970) titriert. Die Bestimmung der TCID₅₀ (tissue culture infective dosis 50) wurde ebenfalls zur Titration infektiöser Partikel bestimmt. Diese Methode mißt allerdings nicht die absolute Menge infektiöser Viren, sondern die Verdünnung eines Überstandes, der 50% der Kulturen infiziert (Leland & French, 1988).

Plaque-Assay:

Hierzu wurden 200×10^3 humane Fibroblasten (HFF) in 60 mm Kulturschalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit dem zu bestimmenden Überstand für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden dafür logarithmisch verdünnt, und jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt, 2-fach MEM und 0,6% Agarose in Aqua dest. zu gleichen Teilen gemischt und gerade noch flüssig über die Zellen gegossen (feste Phase). Darüber wurde normales MEM mit 2% FKS geschichtet. Nach etwa 10 Tagen, wenn die Plaques unter dem Mikroskop sichtbar waren, wurde das Medium und die Agarose entfernt, die Zellen mit 0,03% (w/v) Methylen-Blau gefärbt und die Plaques gezählt. Die Methode beruht darauf, daß die infizierten Zellen durch die feste Agarose-Phase die freigesetzten Viren nur auf die Nachbarzellen übertragen können. Aufgrund der Lyse infizierter Zellen entstehen so "Plaques", die vom intakten, Methylen-Blau gefärbten, dichten Zellrasen umgeben sind.

TCID₅₀:

Hierfür wurden 96-well-plates verwendet und in jedes well 20×10^3 HF in MEM mit 2% FKS ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die ausgesäten HFF's mit dem zu bestimmenden infektiösen Überstand für eine Stunde inkubiert. Dazu wurde der Überstand logarithmisch verdünnt (10^{-1} bis 10^{-9} oder 5^1 bis 5^9) und jeweils 100 µl einer Verdünnung in vier untereinander liegende HF-Kulturen pipettiert (Einzelkulturen). Als Kontrollen dienten nicht infizierte Kulturen (negativ-Kontrolle) und Virusstock (positiv-Kontrolle). Nach der Inkubation wurde das Inokulum abgesaugt und frisches MEM mit 2% FKS hinzu gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol/Aceton 1:1 fixiert und bei -20°C gelagert oder gleich weiter verarbeitet. Zum Nachweis der infizierten Zellen wurden die Zellen für eine Stunde mit 100 µl PBS mit 1% BSA inkubiert um die Zellen zu rehydrieren und unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Als Erstantikörper wurde ein Anti-IE-Antikörper (Dupont, Wilmington, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS / 1% BSA verwendet. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 50 µl dieses Antikörpers bei

Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Als Zweitantikörper diente ein Merettich-Peroxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper, 1:1000 verdünnt in PBS-1% BSA. Es wurde jeweils 50 µl dieses Antikörpers verwendet und 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligen waschen mit PBS erfolgte die eigentliche Färbung mit der Entwicklerlösung (0,5 mg/ml 3,3'-Diamino-benzidin-hydrochlorid (DAB, Fa. Fluka, Neu-Ulm), 0,03% (v/v) H₂O₂ in PBS) für etwa 20 Minuten. Die Zellen wurden dann unter dem Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar) betrachtet und die infizierten Kulturen gezählt. Schon eine infizierte Zelle (positive Kernfärbung) in einer Kultur reicht aus, um als infiziert gewertet zu werden.

Tabelle1: Beispiel einer Berechnung der TCID₅₀

Klassengrenze	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
inf. Kulturen	0	0	0	0	0	3	4	4	4
Klassenmitte		- 8,5	-7,5	-6,5	-5,5	-4,5	-3,5	-2,5	-1,5
Zunahme	0	0	0	0	0	3	1	0	0
Produkte: Klassenmitte x Zunahme	0	0	0	0	0	-13,5	-3,5	0	0

Die TCID₅₀ berechnet man wie folgt:

$\log \text{TCID}_{50}/100 \text{ µl} = \text{Summe der Produkte dividiert durch die Zahl der Einzelkulturen}$

In dem oben gezeigten Beispiel: $13,5 + 3,5 = 17 / 4 = 4,25$

Da sich dieses Ergebnis auf 100 µl bezieht, muß dies noch berücksichtigt werden:

$\text{Titer TCID}_{50} / \text{ml} = \log \text{TCID}_{50} / 100 \text{ µl} + 1$

Bei einem Wert von 5,25 wie im obigen Beispiel bedeutet dies, daß eine Verdünnung des titrierten Kulturüberstandes von 10^{5,25} eine Kultur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% infiziert.

3.2.4 Experimentelle Infektion

Die gewünschte Anzahl Zellen wurde in Infektionsmedium mit 2% FKS ausgesät, so daß eine Konfluenz von 60-80% erreicht war. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen infiziert. Hierzu wurde der Virusstock entsprechend verdünnt und auf die Zellen gegeben. Es reichte aus, den Zellrasen mit dem verdünnten Virusstock gerade zu benetzen. Die Kulturen wurden bei RT auf einem Wiegeinkubator für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgesaugt, frisches warmes Medium hinzugefügt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die ausgesäten Zellzahlen und Virusdosierungen werden in den entsprechenden Kapiteln näher erläutert.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz-Färbung

Für die kinetischen Studien wurden 2×10^6 Zellen (HFF und U373-MG) in 100 mm Kulturschalen ausgesät, in denen sich kleine Deckgläser befanden. Die Zellen wuchsen über Nacht in Infektionsmedium mit 2% FKS, MEM für HFFs und DMEM für U373-MG. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,5 infiziert. Zu den entsprechenden Zeiten wurden jeweils zwei Deckgläser, auf denen Zellen gewachsen sind, entnommen, zweimal mit warmem PBS gewaschen, mit eiskaltem Methanol/Aceton 1:1 fixiert und bei -20°C aufbewahrt. Nachdem die Deckgläser für den letzten Wert 72 h p.i. entnommen und fixiert waren, wurden die gewünschten Antigene mit der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen:

Das Fixans wurde entfernt und die Zellen mit PBS / 1% BSA für eine Stunde bei RT behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Zellen zu rehydrieren. Anschließend erfolgte die Reaktion mit den Erstantikörpern, indem die Zellen zuerst mit dem Anti-IE-Maus-Antikörper (HA 3.551) für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Erstantikörper vom Kaninchen, gegen pp150 (1:250 verdünnt) oder pp65 (1:250), verdünnt in PBS / 1% BSA, ebenfalls für eine Stunde in der Feuchtkammer bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden

die Zellen mit dem Zweitantikörper (1:200 verdünnt) gegen Kanninchen (Fluoreszin-konjugiert) und Maus (Rhodamin-konjugiert) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Deckgläser wurden dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zählen zu können, wurden die Zellkerne bzw. DNA mit dem Hoechst 33258-Farbstoff für wenige Minuten gegengefärbt und einmal mit H₂O gewaschen. Danach wurden die Deckgläser in Moviol auf Objektträgern eingedeckelt. Moviol wurde folgendermaßen hergestellt:

Moviol:

- 2,4 g Moviol Typ 4-88
- 6 g Glycerin
- 6 ml Aqua dest.
- 2 h auf einem Drehschüttler gemischt
- 12 ml 20 mM Tris/HCl pH 8,5
- 10 Min bei 50°C inkubiert
- 15 Minuten bei 3500 g zentrifugiert
- Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

Die Zellen wurden mit einem Leitz Diaplan Mikroskop mikroskopiert und fotografiert.

3.3.2 Detektion von gB auf der Zelloberfläche

Die Zellen wurden einen Tag vor Infektion in 24-well-plates auf Deckgläser ausgesät, 70×10^3 HFFs pro well in MEM / 2% FKS und 90×10^3 U373-MG pro well in DMEM / 2% FKS. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 1. Sechs Tage nach Infektion wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen mit dem eiskaltem Erstantikörper (Anti-gB, 27-156) für 30 Minuten auf Eis auf einem Wiegeinkubator inkubiert, um zu verhindern, daß der Erstantikörper von den Zellen endozytiert wird. Danach wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen mit frisch angesetzttem 4%(w/v)-Paraformaldehyd in PBS bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurde das Paraformaldehyd entfernt und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen anschließend für 10

Minuten mit 0,2% Triton X-100 / PBS behandelt und danach wieder mit PBS gewaschen. Die Rehydrierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 10 Minuten mit 3% BSA in PBS. Nun wurden die Zellen mit dem zweiten Erstantikörper (Anti-pp150) gegengefärbt. Dies und die Reaktion des Zweitantikörpers unterscheidet sich nicht von der bereits erwähnten Doppelimmunfluoreszenz-Färbung, einschließlich Anfärbung der Zellkerne mit Höchst 33258.

Statt des Rhodamin-konjugierten Anti-Maus Zweitantikörpers zum Nachweis von gB wurde ein Texas-Red-konjugierter Anti-Maus-Antikörper benutzt, um Überlagerungen mit Fluoreszein bei der Anregung durch das Fluoreszenz-Mikroskop zu vermeiden.

Die fixierten und in Mowiol eingedeckelten Präparate wurden sowohl durch das herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet als auch mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

3.4 Elektronenmikroskopie

Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Infektionsmedium (MEM bzw. DMEM / 2% FKS) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einer MOI von 0,5 infiziert. Als negativ- Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen benutzt.. 3 bzw. 6 d p.i. wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit folgender Lösung fixiert:

2,5% (w/v) Paraformaldehyd

2,5% (w/v) Glutaraldehyd

0,05% Pektinsäure

in 100mM Cacodylat pH 7,3.

Nach einer 30 minütigen Fixierung mit dieser Fixierlösung bei RT wurden die Zellen mit einem Schaber vom Boden der Kulturflaschen gelöst und für 10 Minuten bei 14.000 g mit einer Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend erfolgte die Imprägnierung mit 1% OsO₄ und 1,5% Kaliumferrocyanid für 1 Stunde bei 4°C. Nach erneutem waschen mit H₂O wurden die Zellen dann für 1 Stunde bei RT mit 0,3% Uranylacetat und 50 mM Maleylsäure pH 5,0 inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Die daraufhin folgende Entwässerung erfolgte in aufsteigenden

Ethanol-Konzentrationen. Die Zellen wurden dann in Epon eingebettet. Die Blöcke wurden in 50 bis 80 nm dünne Scheiben geschnitten und mit einem EM 9 Elektronenmikroskop der Firma Karl-Zeiss Oberkochen untersucht und fotografiert.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Freisetzung infektiöser viraler Partikel

Zur Charakterisierung und Bestimmung des Permissivitätsgrades der Astrozytom-Zelllinie U373-MG diente als erstes die Bestimmung der Menge der freigesetzten infektiösen viralen Partikel.

Hierzu wurden von beiden Zellarten, also primäre humane Fibroblasten (HFF) und U373-MG, 6×10^6 Zellen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit einer MOI von 0,5 mit dem *humanen Zytomegalievirus* infiziert. Zur Virustitration wurden die Überstände von 3 d p.i. und 6 d p.i. benutzt und mit dem Plaque-Assay titriert. Hier zeigten sich sehr deutliche Unterschiede in der Freisetzung viraler Partikel. Im Vergleich zu humanen Fibroblasten zeigten U373-MG Zellen eine ca. 200-fach geringere Freisetzung infektiöser viraler Partikel. Mit einer ca. 20.000-fach geringeren Freisetzung viraler infektiöser Partikel ist der Unterschied zu humanen Fibroblasten 6 d p.i. noch deutlicher (Abb. 6).

Eine verzögerte Freisetzung infektiöser Viruspartikel konnte durch die Titration von Überständen 9 d p.i. ausgeschlossen werden. Sowohl die HFF- als auch die U373-MG-Kultur zeigte keine deutliche Steigerung der Virusfreisetzung.

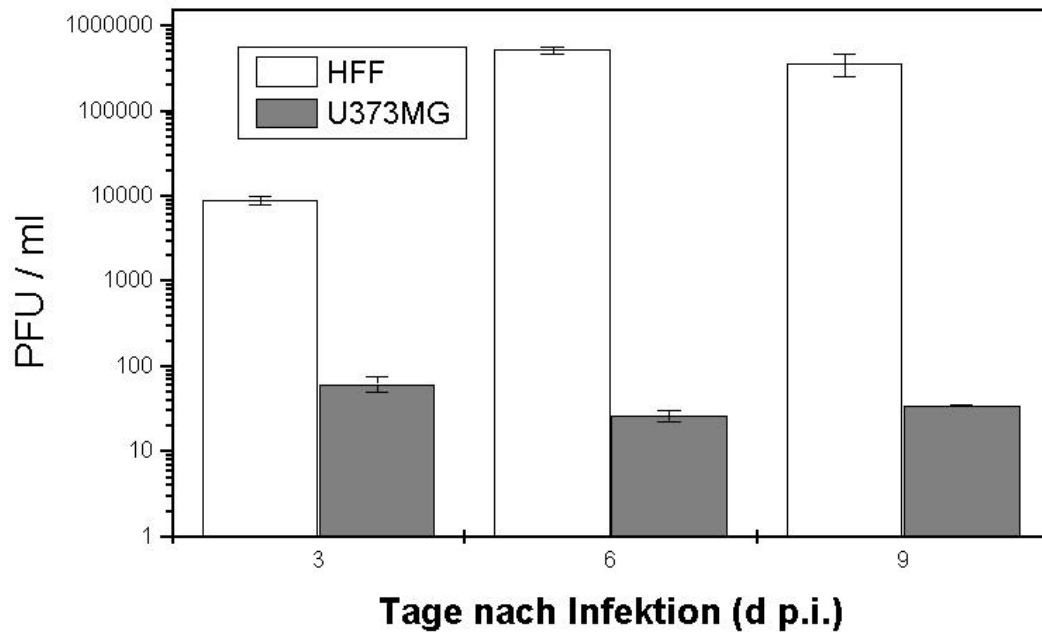


Abb. 6: Titration der freigesetzten Viren

Je 2×10^6 Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert. 3, 6 und 9 Tage nach Infektion wurden die Kulturüberstände mit Plaque-Assay zur Bestimmung der freigesetzten Viren titriert. U373-MG zeigt im Vergleich zu Fibroblasten eine deutlich geringere Freisetzung viraler Partikel. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei Titrationen. (PFU: Plaque forming units)

Unter dem Mikroskop betrachtet, zeigten sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den infizierten humanen Fibroblasten und U373-MG. Die humanen Fibroblasten waren 9 d p.i. vollständig lysiert während die U373-MG Kulturen hingegen stark proliferiert waren und nur einzelne Zellen einen zytopathischen Effekt in Form von abgerundeten Zellen zeigten.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich mit einer höheren Infektionsdosis die Freisetzung infektiöser Virionen in U373-MG-Kulturen steigern lässt. Die Zellen wurden entweder mit einer MOI von 1 oder 10 infiziert und die Überstände 6 d p.i. titriert.

Aber auch bei einer 10-fach höheren Infektionsdosis (MOI 10) ließ sich die Freisetzung infektiöser viraler Partikel in der U373-MG-Kultur nicht deutlich steigern (Abb. 7).

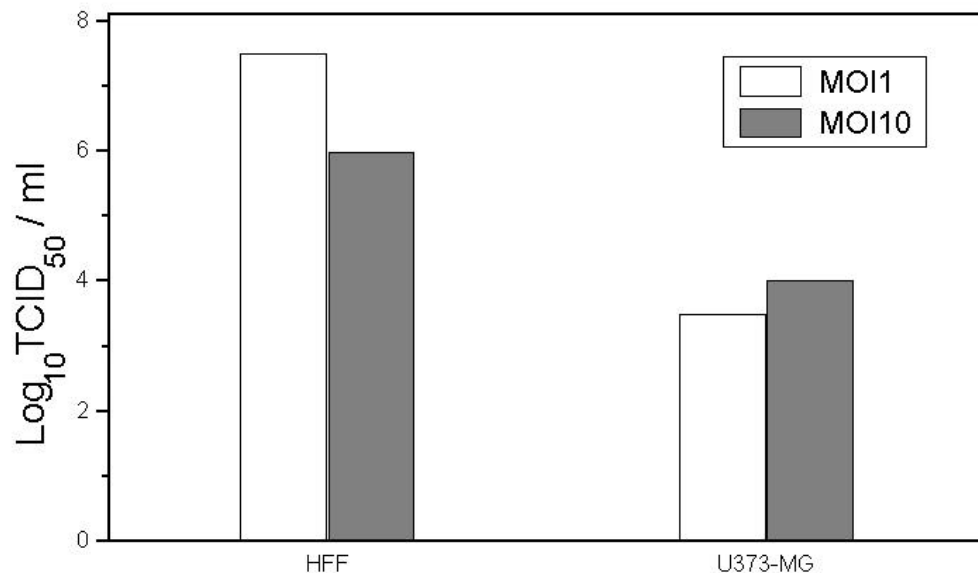


Abb. 7: Virustitration der Kulturüberstände 6 d p.i., HFF und U373-MG bei unterschiedlicher Infektionsdosis. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1 bzw. MOI von 10 infiziert und 6 Tage nach Infektion wurde die TCID₅₀ der Kulturüberstände bestimmt. Durch eine höhere Infektionsdosis läßt sich die Virusfreisetzung in U373-MG nicht steigern.

4.2 Untersuchungen zur Proteinexpression der unterschiedlicher Phasen der viralen Replikation

Die Virusreplikation läßt sich in drei nacheinander ablaufende Phasen bezüglich Gen- bzw. Proteinexpression einteilen. Deshalb wurde untersucht, in welchem Ausmaß die infizierten Astrozytom-Zellen zum einen die Proteine der α -Phase (sehr früh) und zum anderen die Proteine der γ -Phase (spät) synthetisieren, denn

Voraussetzung für die Virusproduktion ist neben der Replikation der virale DNA die Synthese der viralen Strukturproteine in der γ -Phase.

Als Marker für die α -Phase dienten die beiden wichtigsten Proteine dieser Phase, IE1 und IE2. Für die γ -Phase wurde das Tegumentprotein pp150 (UL32) als Markerprotein verwendet.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten die Anzahl der für die Markerproteine positiven Zellen ausgezählt. Durch Verwendung der Doppelimmunfluoreszenz konnten beide Markerproteine in einem Präparat parallel dargestellt werden.

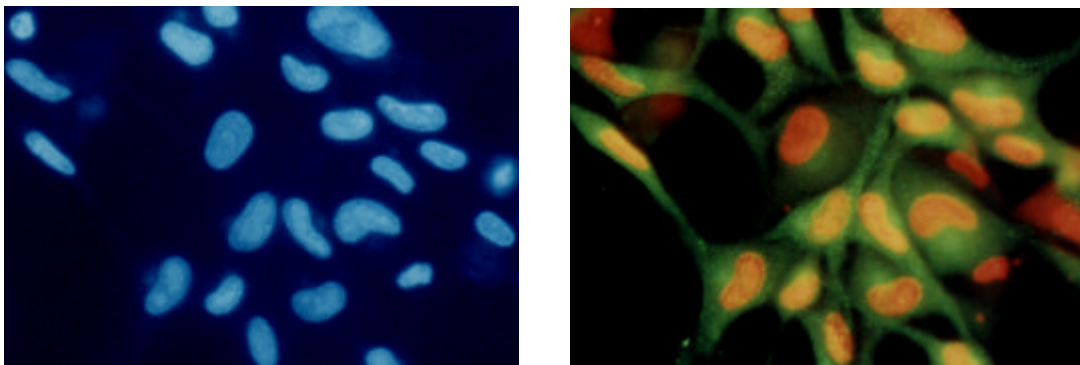


Abb. 8: Humane Fibroblasten, 6 d p.i.

rechts: Doppelimmunfluoreszenz. IE1 und IE2 (orange) und pp150 (grün) 6 p p.i.
Doppelbelichtung

links: Anfärbung der DNA mit Hoechst-Farbstoff, gleicher Ausschnitt

Die humanen Fibroblasten sind 6 d p.i. zu 100% positiv sowohl für die beiden Hauptproteine der α -Phase (IE1 und IE2) als auch für die Proteine der γ -Phase, hier pp150

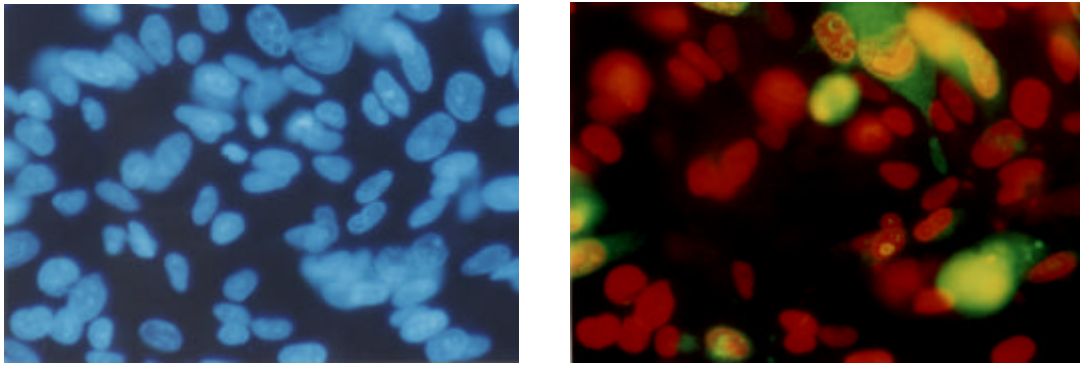


Abb 9: U373-MG 6 p.i.

rechts: Doppelimmunfluoreszenz. IE1 und IE2 (orange) und pp150 (grün) 6 d p.i., Doppelbelichtung

links: Anfärbung der DNA mit Hoechst-Farbstoff, gleicher Ausschnitt

In diesem Ausschnitt sind etwa 55% der Zellen IE-positiv.

Die Astrozytom-Zelllinie U373-MG zeigt im Gegensatz zu humanen Fibroblasten (Abb. 8) einen geringeren Prozentsatz IE-positiver Zellen. Deutlich ist auch, daß nicht alle IE-positiven Zellen Proteine der γ -Phase synthetisieren. Ebenfalls auffällig ist, daß die Zellen stark proliferiert sind (Abb. 9). Auch mehrkernige Riesenzellen sind in infizierten U373-MG-Kulturen oft zu finden.

Zur näheren Charakterisierung dieser Beobachtung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion fixiert. Anschließend wurden die beiden Markerproteine in der Doppelimmunfluoreszenz dargestellt und durch auszählen die Anzahl der IE- bzw. pp150-positiven Zellen bestimmt.

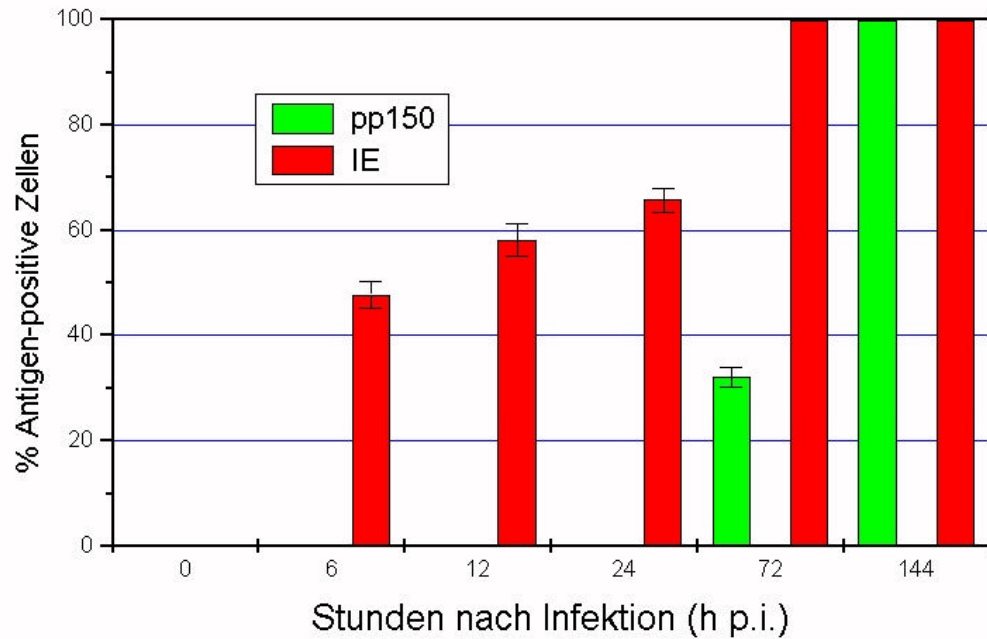


Abb. 10: Expression von IE und pp150 zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. in humanen Fibroblasten. Die Zellen wurden in einer Schale ausgesät, zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Deckgläser entnommen, fixiert und gefärbt. Die positiven Zellen wurden gezählt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Zahl der positiven Zellen steigt kontinuierlich bis 100% 6 d p.i. an.

Die Zellen wurden dazu in einer Schale mit mehreren Deckgläsern ausgesät und infiziert. Zu den definierten Zeitpunkten wurden jeweils zwei Deckgläser aus dieser Schale entnommen und fixiert. Dies gewährt für alle Zeitpunkte gleiche Bedingungen. Als Zeitpunkte wurden 0, 6, 12, 24, 72 und 144 h p.i. verwendet. Nach dem letzten Zeitpunkt wurden die Zellen dann mit Antikörpern gegen IE1 + IE2 sowie mit Antikörpern gegen pp150 angefärbt. Die Zellkerne, bzw. DNA wurden mit Hoechst gegengefärbt, um das auszählen zu erleichtern. Die einzelnen Zeitpunkte wurden dann unter dem Mikroskop bei mittlerer Vergrößerung ausgewertet, indem pro Deckglas vier zufällig gewählte Gesichtsfelder ausgezählt wurden.

Der Zeitpunkt 0 h p.i., also direkt nach der Infektion entnommen, diente hier als Kontrolle. Wie die Abbildung 10 zeigt, steigt die Zahl der IE-positiven HFFs von 6 h p.i. bis 24 h p.i. leicht bis zu ca. 67% an, ohne daß Proteine der γ -Phase nachweisbar sind. Bereits 72 h p.i. sind alle Zellen IE-positiv. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits in ca. 32% aller Zellen Proteine der γ -Phase (pp150) nachweisbar. 144 h p.i. sind schließlich alle Zellen IE- und pp150-positiv, und alle Zellen zeigten einen deutlichen zytopathischen Effekt.

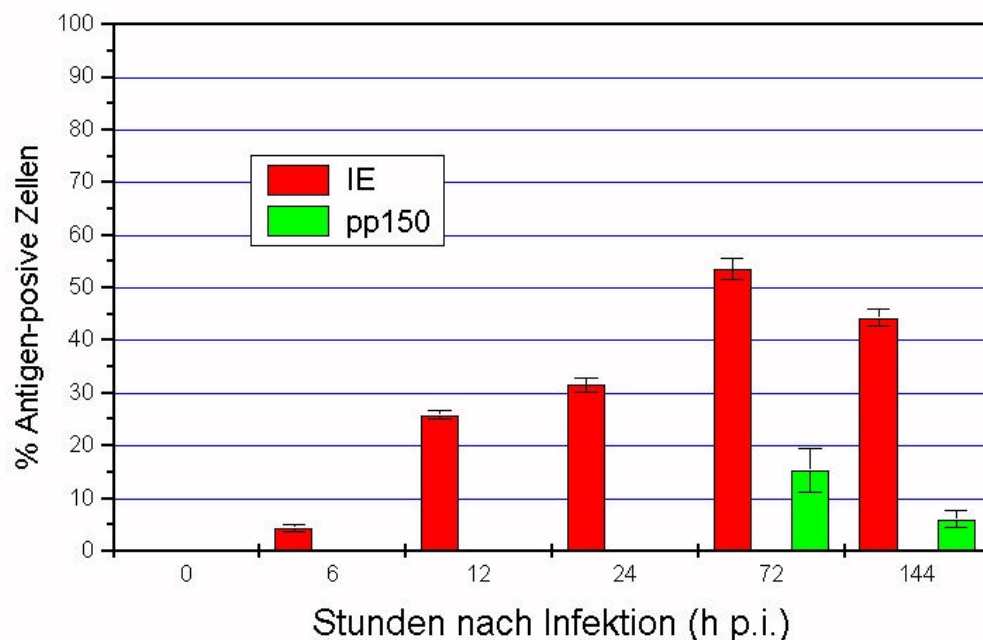


Abb 11: Expression von IE und pp150 zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. in U373-MG. Die Zellen wurden in einer Schale ausgesät, zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Deckgläser entnommen, fixiert und gefärbt. Die positiven Zellen wurden gezählt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Anzahl positiver U373-MG steigt im Gegensatz zu Fibroblasten im Verlauf der Infektion nicht auf 100% an, sondern fällt nach 3 Tagen wieder ab.

Im Gegensatz zu den humanen Fibroblasten, weichen die Ergebnisse der Kinetik von U373-MG deutlich ab (Abb.11). Auch hier läßt sich von 6 h p.i. bis 24 h p.i. ein

Anstieg IE-positiver Zellen beobachten, aber 24 h p.i. sind nur ca. 31% positiv für die Antigene IE1 und IE2. Auch hier sind zu diesem Zeitpunkt noch keine späten Antigene (pp150) nachweisbar. Zum Zeitpunkt 72 h p.i. steigt die Anzahl IE-positiver Zellen, wie auch bei HFF an, erreicht aber nur einen Wert von etwa 53% (Fibroblasten 100%). Die Menge der Zellen, die 72 h p.i. Proteine der γ -Phase (pp150) synthetisieren, beträgt nur etwa 15% der Gesamtzellzahl. Anders als bei HFF gibt es keine weitere Steigerung der Proteinexpression bis 144 h p.i. Die Anzahl IE- und pp150-positiven Zellen sieht rückläufig aus, so daß 144 h p.i. nur noch 43% IE-positiv und nur noch 6% pp150-positiv sind. Auffällig ist, daß die Anzahl pp150-positiver Zellen deutlich unter der IE-positiver Zellen liegt.

Auch mit höheren Infektionsdosen läßt sich die Menge der IE-exprimierenden Zellen nicht steigern.

Wenn man die Zellen, die späte Proteine exprimieren, auf die Menge IE-positiver Zellen bezieht, sind 72 h p.i. 29% und 144 h p.i. 14% pp150-positiv.

Andere virale Strukturproteine der γ -Phase wie das Glykoprotein gB und das Tegument pp65 zeigen die gleichen Werte wie pp150. Somit ist in U373-MG nicht nur die Synthese von pp150, sondern generell die Synthese der Proteine der γ -Phase blockiert.

Der Rückgang der in dem Diagramm dargestellten Proteinexpression bei U373-MG ist darauf zurückzuführen, daß die vermutlich nicht infizierten Astrozytom-Zellen weiterhin proliferieren. Eine Bestimmung der Zellzahl der infizierten U373-MG Kultur zeigt einen Anstieg von 2×10^6 ausgesäten Zellen auf $6,5 \times 10^6$ 6 d p.i.. Das ist mit der Proliferationsrate einer nicht infizierten U373-MG Kultur vergleichbar. Das bedeutet, daß der beschriebene Rückgang der IE- und pp150-positiven Zellen aufgrund der Zunahme der nicht infizierten Zellen nur relativ ist.

Bezieht man die IE- und pp150-positiven Zellen auf die Zellzahl 144 h p.i. sind tatsächlich $2,8 \times 10^6$ Astrozytom-Zellen IE-positiv, aber nur $0,36 \times 10^6$ Zellen pp150-positiv (Abb. 12).

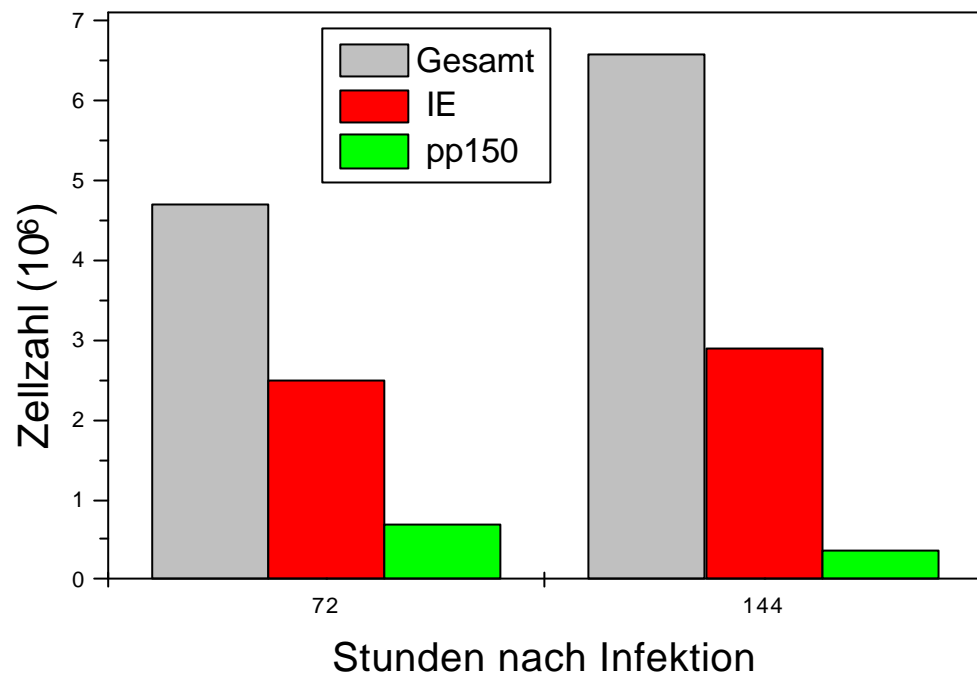


Abb 12: Es wurden 2×10^6 U373-MG Zellen ausgesät und anschließend mit einer MOI von 1 infiziert. 72 bzw. 144 Stunden nach Infektion wurden die Zellen gezählt. Durch die auf einem Deckglas gewachsenen Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz die prozentualen Anteile an IE- und pp150-positiven Zellen ermittelt und durch Hochrechnung auf die Gesamtzellzahl im Diagramm dargestellt. Man sieht die deutliche Zunahme der Gesamtzellen, jedoch keine deutliche Zunahme an IE-positiven Zellen und eine Abnahme an pp150-positiven Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Zelllinie U373-MG i) nur etwa 50% der Zellen mit der Replikation viraler IE-Proteine beginnt, ii) nur sehr wenige Zellen virale Strukturproteine in der späten Phase synthetisieren (pp150), iii) die Kultur weiterhin stark proliferiert.

Somit liegen hier zwei Defekte in der Virusreplikation vor: nur 50% der Zellen der infizierten Kultur sind soweit permissiv, daß sie mit der IE-Phase der Virusreplikation beginnen. Von diesen IE-positiven Zellen geht nur ein geringer Teil in die späte Phase zur Synthese von viralen Strukturproteinen über. Das bedeutet

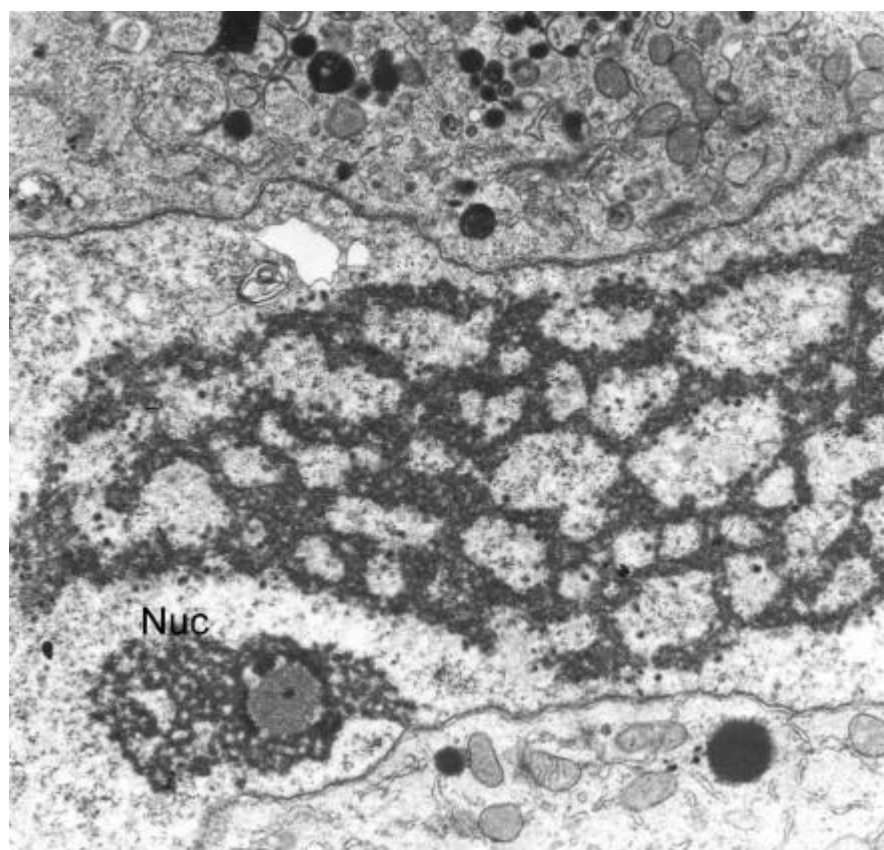
wiederum, daß nur die wenigen pp150-positiven Zellen überhaupt reife Viruspartikel synthetisieren können.

4.3 Ultrastrukturelle Untersuchung infizierten Zellen

Die bisherigen Immunfluoreszenz-Experimente zeigten, daß nur 15% der Zellen einer HCMV-infizierten U373-MG Kultur in die späte Phase der Virusreplikation eintreten, und damit durch die Synthese der viralen Strukturproteine fähig sind, Viruspartikel zusammenzubauen. Setzt man voraus, daß die Virusproduktion in diesen Zellen der von Fibroblasten in etwa entspricht, würde man erwarten, daß der Virustiter von infizierten U373-MG Kulturüberständen ebenfalls etwa 15% vom Virustiter der HFF-Kulturüberständen messen würde. Da der Virustiter von infizierten U373-MG Kulturen aber deutlich geringer ist, muß die Virusreifung im Zellkern oder Zytoplasma in U373-MG gestört sein. Deswegen wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen angeschlossen.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung infizierter Zellen zeigt ebenso deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zellarten.

HFF



U373-MG

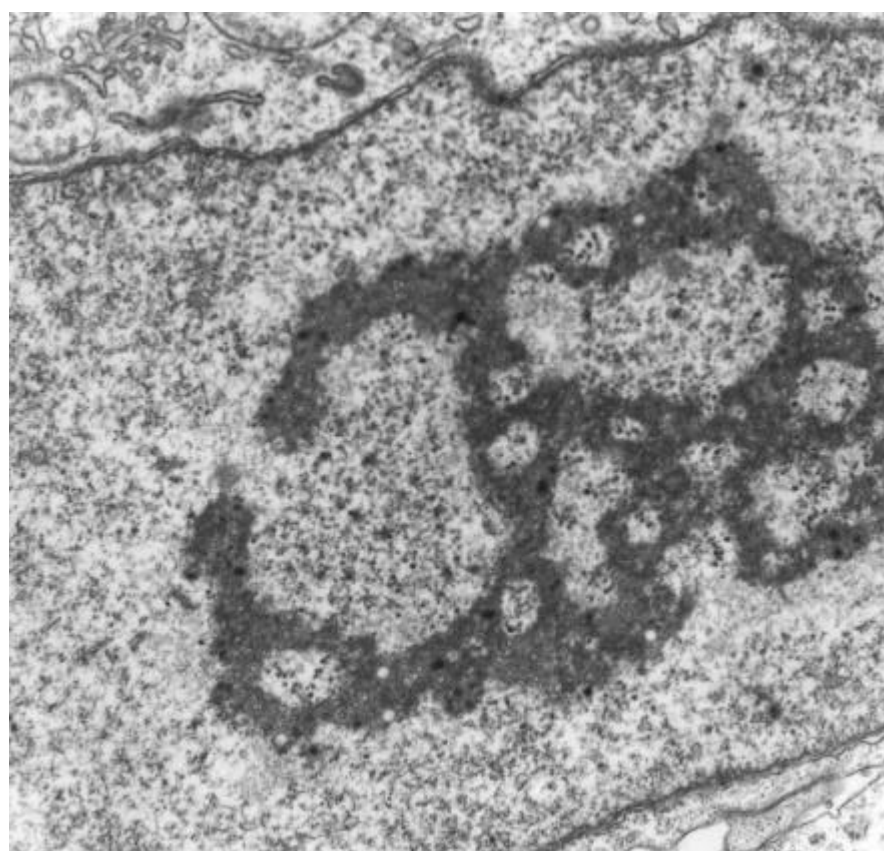
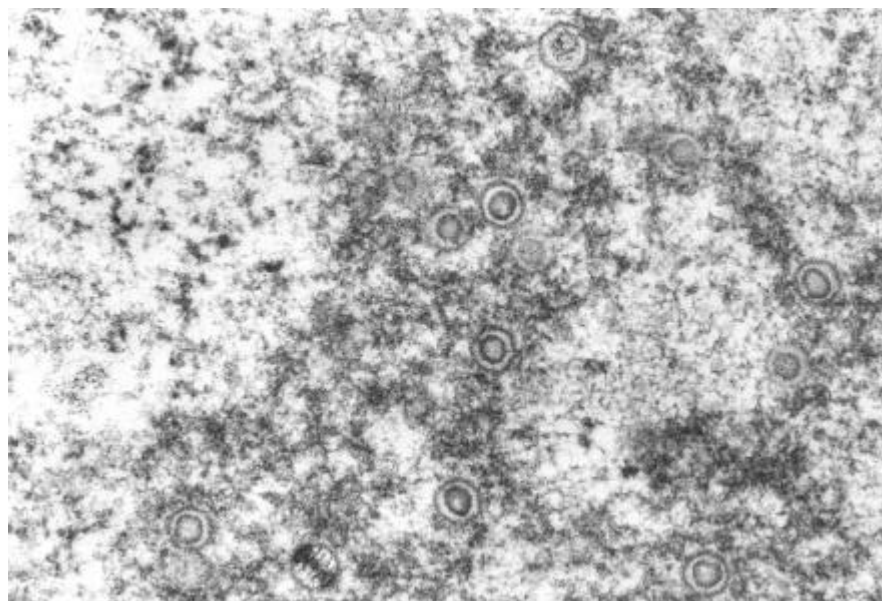


Abb. 13: Zellkern Übersicht, 6 d p.i.

HFF



U373-MG

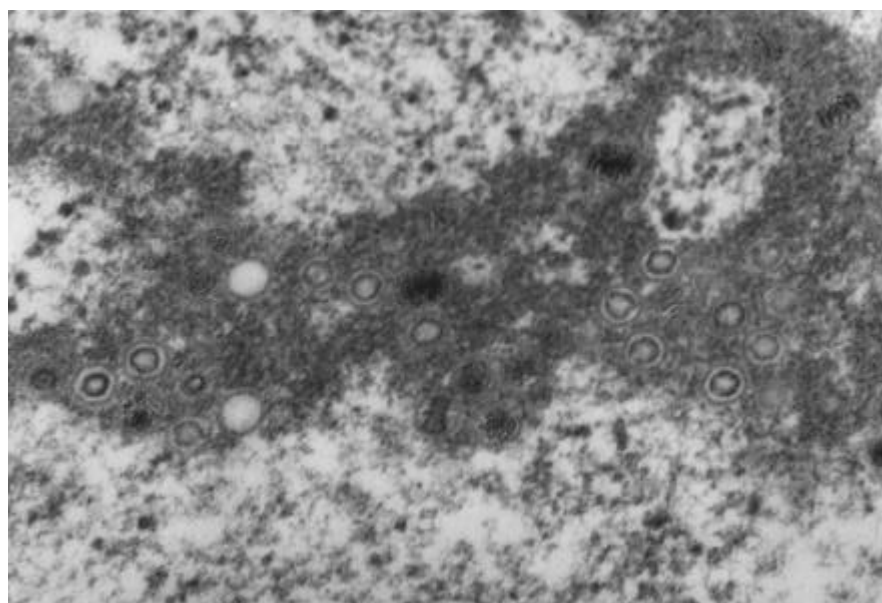
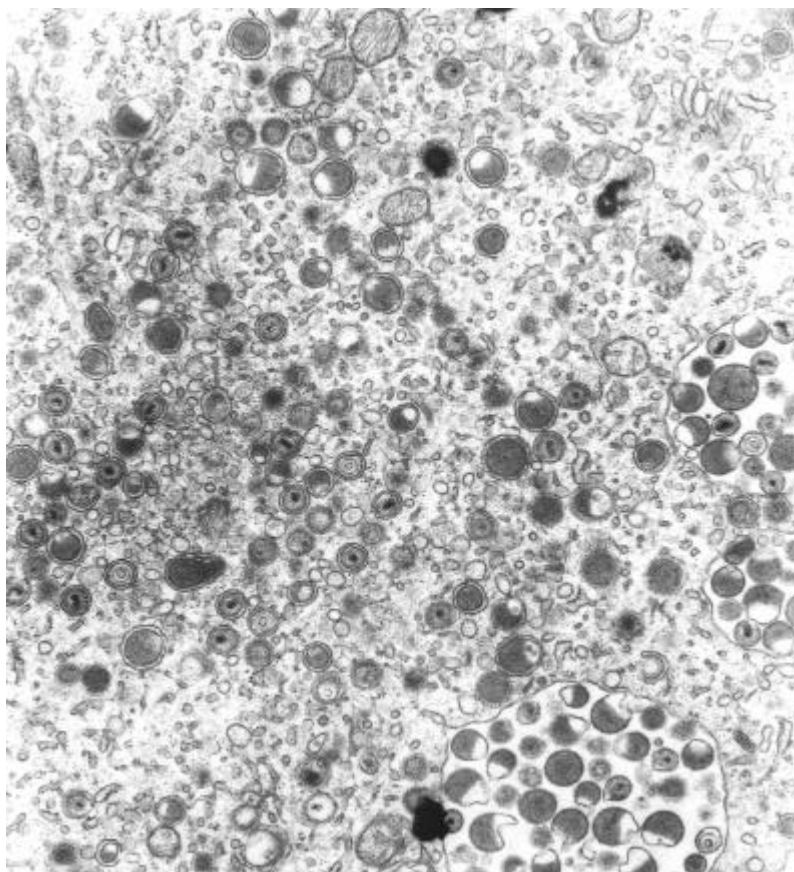


Abb. 14: Zellkern im Detail, 6 d p.i.

HFF



U373-MG

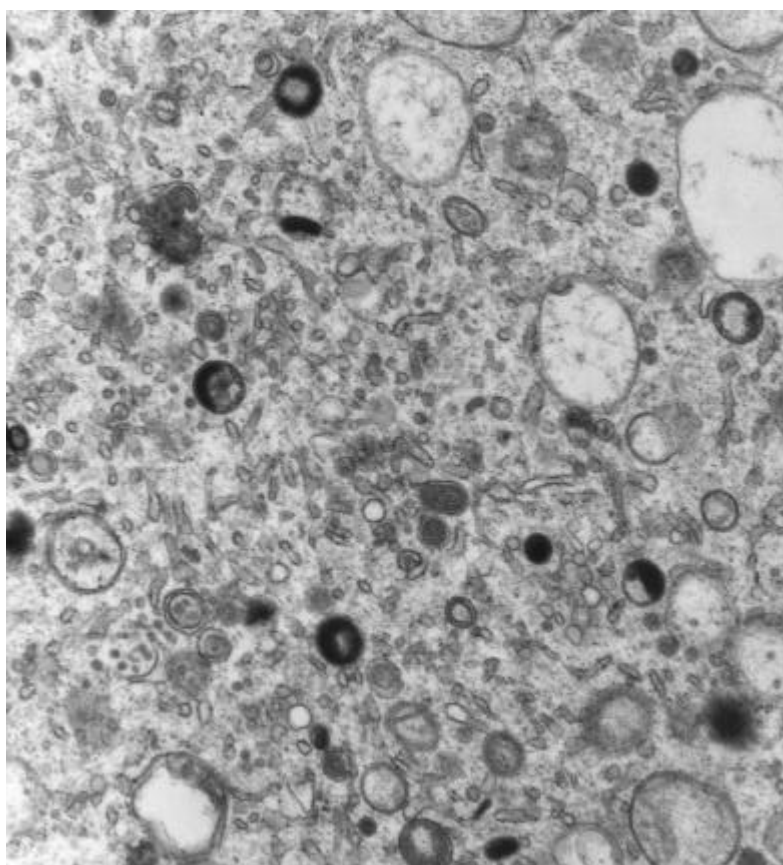


Abb. 15: Zytoplasma 6 d p.i.

Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellkernen von HCMV-infizierten Zellen 6 d p.i. im Überblick. Im Vergleich zu Fibroblasten ist die Skein-Struktur in U373-MG deutlich geringer ausgeprägt (Nuc: Nukleolus).

Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellkernen HCMV-infizierter Zellen 6 d p.i. im Detail. Im Vergleich zu Fibroblasten finden sich deutlich weniger Nukleokapside in der Skein-Struktur in U373-MG. Jedoch finden sich alle Stadien der Nukleokapsid-Reifung, also auch reife, DNA-haltige Nukleokapside in U373-MG. Häufig findet man auch in infizierten U373-MG elektronendichte, runde Strukturen, sogenannte nukleäre „dense bodies“.

Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme vom Zytoplasma HCMV-infizierter Zellen 6 d p.i. Im Zytoplasma von U373-MG findet man deutlich weniger Viruspartikel als im Zytoplasma von Fibroblasten, dennoch findet man alle Stadien der Reifung, also nackte Viruspartikel, Stadien der Umhüllung, „dense bodies“ und NIEPs.

Nucleus

Lichtmikroskopisch zeigen sich bereits in Form von nukleären Einschlüßkörperchen Veränderungen im Zellkern. Diese Veränderungen sind allerdings nur in den Zellen zu sehen, die in der späten Phase der Virusreplikation virale Strukturproteine synthetisieren. Das bedeutet, daß nur insgesamt 6% (144 h p.i.) der Zellen einer infizierten U373-MG Kultur diese nukleäre Struktur ausbilden.

Bei dieser nukleären Struktur handelt es sich um das sogenannte Skein, das bei der Nukleokapsid-Morphogenese, also dem Zusammenbau der Kapside und der Verpackung der viralen DNA, von Bedeutung ist. In *in situ* Hybridisierungen zum Nachweis der HCMV-DNA läßt sich diese Struktur darstellen (Weber, 1998).

Elektronenmikroskopisch findet man demnach nur in wenigen Zellen einer infizierten U373-MG Kultur diese Skein-Struktur im Zellkern (Abb. 13).

Bei starker Vergrößerung findet man auch im Skein zahlreiche Kapside aller Reifungsformen. Im Vergleich zeigt sich, daß in infizierten Astrozytom-Zellen die Anzahl der Kapside im Skein deutlich geringer ist als in infizierten Fibroblasten. Dennoch sind alle Stufen der Nukleokapsidreifung nachweisbar (Abb. 14). Somit ist die Nukleokapsidreifung in den infizierten Astrozytom-Zellen, die die Skein-Struktur ausbilden, zwar quantitativ, aber nicht qualitativ gestört, so daß zahlreiche reife Nukleokapside synthetisiert werden. Sehr häufig sind die elektronendichten, runden Strukturen in infizierten U373-MG zu finden, wobei es sich wahrscheinlich um die nukleären „dense bodies“ handelt. An diese Strukturen sind zahlreiche Nukleokapside angelagert (Abb. 16).

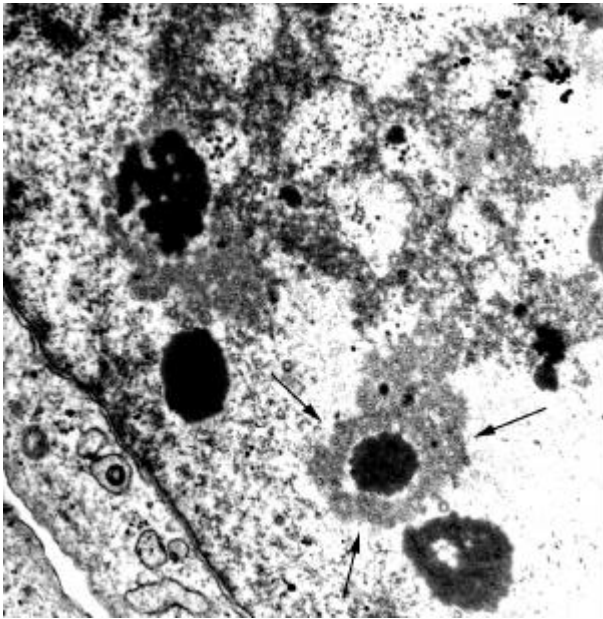


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HCMV-infizierten U373-MG Zelle 6 Tage nach Infektion. Hier sind einige nukleäre „dense bodies“ gezeigt, die teilweise am Rand der Skein-Struktur, teilweise auch unabhängig davon vorkommen. Die Pfeile zeigen die zahlreichen Nukleokapside, wie sie um diese nukleären „dense bodies“ angeordnet sind.

Zytoplasma

Vergleicht man die weiteren Reifungsprozesse im Zytoplasma, also in erster Linie die Reifungsknospung, finden man in beiden Zellarten alle Stadien der Reifung, also nackte Viruspartikel, Stadien der Umhüllung und umhüllte Viruspartikel wieder. Ein Vergleich zeigt aber wesentlich weniger Viruspartikel, sowohl reife, als auch NIEPs und „dense bodies“ im Zytoplasma von U373-MG (Abb. 15). Im Zytoplasma von infizierten Fibroblasten sind Nukleokapside in sehr großer Zahl vorhanden und auch die typischen Vakuolen mit Ansammlungen von Kapsiden sind deutlich sichtbar (Serveri et al., 1988).

Der Nächste Schritt, die Freisetzung viraler Partikel, ist in U373-MG deutlich reduziert. Im Gegensatz zu infizierten Fibroblasten, bei denen man die Freisetzung reifer viraler Partikel immer wieder findet, läßt sich die Freisetzung von Viruspartikeln in produktiv infizierten U373-MG nur extrem selten beobachten.

4.5 Expression von gB auf der Zelloberfläche

Nach Radsak et al. (1995) ist die Expression von viralen Glykoproteinen auf der Zelloberfläche und die anschließende Reinternalisierung für den letzten Schritt der Virusreifung, dem Umhüllungsprozeß, wichtig. Es wird postuliert, daß bei der Umhüllung der Nukleokapside eine Interaktion der viralen Glykoproteine mit dem Tegument eine Rolle spielt, also müssen die viralen Glykoproteine zum Ort der Nukleokapsidumhüllung, dem frühen Endosom, transportiert werden. Die Glykoproteine werden nach der Modifizierung im Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert und von dort wieder internalisiert. So gelangen die viralen Glykoproteine ins frühe Endosom.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung hat gezeigt, daß die Freisetzung von Viruspartikeln von Astrozytom-Zellen extrem selten ist. Die Umhüllung der Nukleokapside im Zytoplasma infizierter Astrozytom-Zellen findet, verglichen mit infizierten Fibroblasten, in sehr geringerem Umfang statt.

Deshalb wurde überprüft, ob das virale Glykoprotein gB, das am besten charakterisierte virale Glykoprotein, auf der Zelloberfläche infizierter Zellen nachweisbar ist.

Bereits in den vorangegangenen Immunfluoreszenz-Experimenten ließ sich erkennen, daß gB zwar im Zytoplasma aller produktiv (pp150-positiven) infizierten Astrozytom-Zellen zu finden ist, aber auf der Zelloberfläche ließ sich kein gB erkennen, wohingegen infizierte Fibroblasten eine deutliche Färbung der Zellmembran aufwiesen.

Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde nur das sich auf der Zelloberfläche befindende gB mittels Immunfluoreszenz detektiert, indem man die lebenden infizierte Zellen mit dem Anti-gB-Antikörper bei 4° C inkubiert. Diese Temperatur ist notwendig, um die Internalisierung des Antikörpers zu verhindern und nur die Bindung des Antikörpers an gB auf der Zelloberfläche zu ermöglichen (siehe Material und Methoden). Anschließend wurden die Zellen fixiert. Als Kontrolle, daß die Zellen produktiv infiziert sind, wurde anschließend, nach Permeabilisierung der

Zellen, mit dem Antikörper gegen pp150 gegengefärbt. So konnten produktiv infizierte Zellen unter dem Mikroskop leicht identifiziert werden.

Auf der Zelloberfläche von infizierten Fibroblasten konnte man eine deutliche punktförmige Verteilung von gB auf der gesamten Zelloberfläche nachweisen. Hingegen ließ sich bei U373-MG kein gB auf der Zelloberfläche nachweisen, obwohl die Zellen sicher produktiv infiziert waren, da sie pp150 und somit auch gB exprimierten.

Dies wurde in einem parallelen Versuchsansatz bestätigt, indem nicht nur das oberflächliche, sondern das gesamte, also auch intrazelluläre gB und pp150 gleichzeitig in Form von Doppel-Immunfluoreszenz detektiert wurden. Diese Kontrolle zeigte, daß alle pp150-positiven Zellen auch gB synthetisieren.

Um zu zeigen, daß bei diesem Experiment tatsächlich nur gB auf der Zelloberfläche detektiert wurde, und nicht intrazelluläres gB, wurden die Zellen mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops untersucht. Hier zeigte sich ebenso wie bei der normalen Immunfluoreszenz eine punktförmige Verteilung von gB auf der Zelloberfläche bei infizierten Fibroblasten (Abb. 17). Jedoch ließ sich gB auf der Zelloberfläche infizierter und pp150-positiver Astrozytom-Zellen nicht nachweisen (Abb. 18).

Das bedeutet, daß ein wichtiger Schritt der Virusreifung, der Umhüllungsprozeß der Nukleokapside am frühen Endosom in infizierten Astrozytom-Zellen dadurch gestört ist, daß die viralen Glykoproteine nicht ins frühe Endosom gelangen.

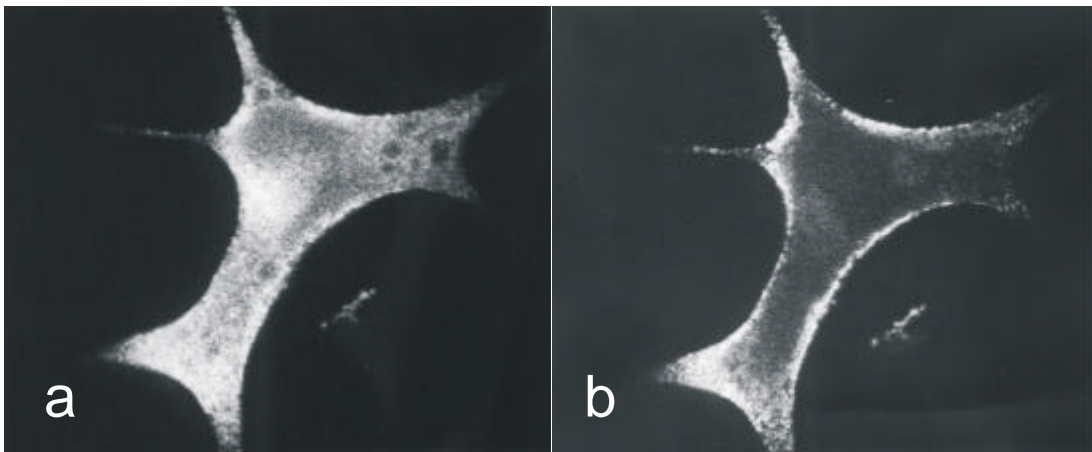


Abb. 17: Laserscanning-Mikroskopie von infizierten humanen Fibroblasten zum Nachweis vom viralen Glykoprotein gB auf der Zelloberfläche. a) pp150, b) oberflächliches gB. Es zeigt sich eine deutliche Lokalisation von gB in der Zellmembran.

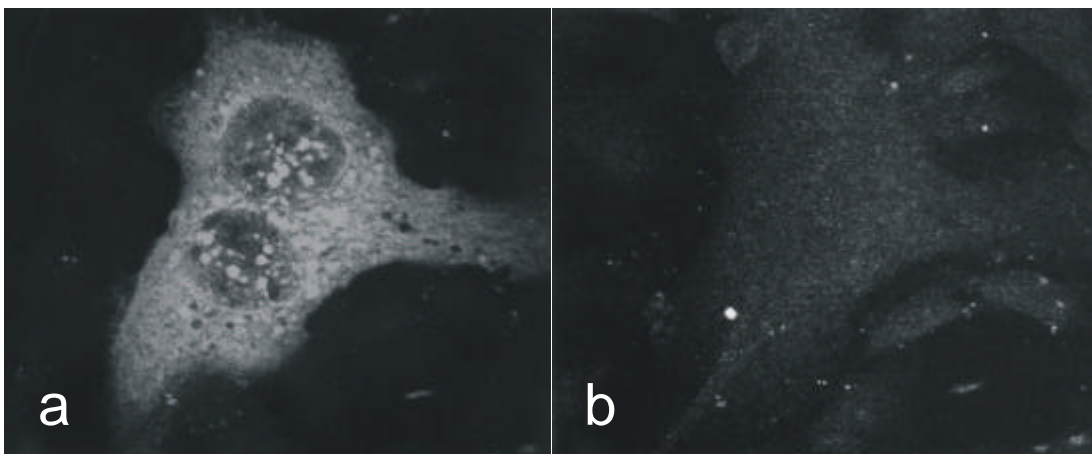


Abb. 18: Laserscanning-Mikroskopie von infizierten U373-MG zum Nachweis vom viralen Glykoprotein gB auf der Zelloberfläche.

a) Nachweis von pp150. b) Nachweis von gB auf der Zelloberfläche.

Im Gegensatz zu Fibroblasten läßt sich auf der Zelloberfläche infizierter U373-MG kein gB nachweisen. Die parallele Färbung mit anti-pp150 (mitte) zeigt, daß die späten viralen Proteine synthetisiert werden. Auch ein z-Scan durch die gesamte Zelle (unten) zeigt kein gB auf der Zelloberfläche (Abb. 19).

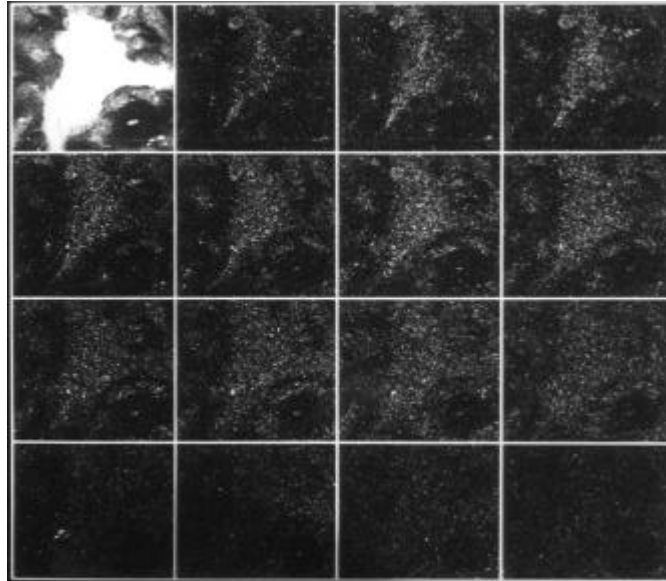


Abb. 19: Die gleiche Zelle wie in Abb. 18 wurde schichtweise durch einen sogenannten z-Scan aufgenommen. Das erste Feld zeigt den Nachweis von pp150 als Kontrolle, daß die Zelle infiziert ist und späte virale Strukturproteine exprimiert. Die restlichen Felder zeigen den z-Scan zum Nachweis von gB auf der Zelloberfläche. Es ist kein gB nachweisbar.

5 Diskussion

Humane Fibroblasten sind für die Durchführung von vielen Experimenten bezüglich der Replikation und Morphogenese des *humanen Zytomegalievirus* von großer Bedeutung. Für Experimente, bei denen stabile Transfektionen notwendig sind, z. B. Antisense-Experimente zur Inhibition der pp150-mRNA (Meyer et al., 1997), zur Herstellung von defizienten Viren mit der gezielten Ausschaltung eines viralen Gens, wie die Herstellung eines pp65-defizienten Virus (Schmolke et al., 1995) oder die Untersuchung der Expression eines bestimmten viralen Gens, wie z. B. die Expression des Glykoproteins gB (Reis et al., 1993), muß man auf Tumorzelllinien, z.B. die Astrozytom-Zelllinie U373-MG zurückgreifen, die als permissiv für die Replikation von HCMV gilt.

Die Aussagekraft von Experimenten unter Benutzung dieser Zelllinie ist allerdings limitiert, da die Virusreplikation in U373-MG im Vergleich zu humanen Fibroblasten deutlich vermindert ist (Poland et al., 1990).

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Zelllinie U373-MG bezüglich der Replikation des *humanen Zytomegalievirus* im Vergleich zu humanen Fibroblasten charakterisiert werden, um mögliche Replikationsblockaden bei U373-MG aufzuklären.

Zu Beginn der Untersuchung wurde die Freisetzung infektiöser Viruspartikel titriert, bei denen sich eine deutlich verminderte Virusfreisetzung von infizierten U373-MG Kulturen zeigte. Eine verzögerte Virusreplikation und Freisetzung der Viruspartikel konnte durch Titration später Zeitpunkte (9 d p.i.) ausgeschlossen werden. Ebenso ließ sich durch Erhöhung der Infektionsdosis kaum eine Steigerung der Virusfreisetzung erzielen.

Die daraufhin folgenden Immunfluoreszenz-Experimente zeigten, daß zwar etwa 50% der Astrozytom-Zellen nach Infektion mit HCMV in die α -Phase der Genexpression eintreten, aber nur ein geringer Teil davon späte virale Strukturproteine der γ -Phase synthetisiert.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte in den wenigen Astrozytom-Zellen, die späte Strukturproteine exprimieren, daß die Nukleokapsid-Reifung im

Zellkern qualitativ nicht gestört ist. Es finden sich im Zellkern vom produktiv infizierten U373-MG alle Stadien der Nukleokapsid-Reifung, also A-, B- und reife C-Kapside. Im Vergleich zu Fibroblasten ist die Anzahl der Kapside allerdings geringer, jedoch findet man viele nukleäre „dense bodies“ im Zellkern infizierter Astrozytom-Zellen, an die Nukleokapside angelagert sind. Im Zytoplasma ist die Menge an Nukleokapsiden stark reduziert, der Umhüllungsprozeß seltener und die Freisetzung viraler Partikel extrem selten.

Experimente zur Detektion des viralen Glykoproteins gB, ein wesentlicher Bestandteil der Virushülle und wesentlich beim zytoplasmatischen Umhüllungsprozeß, konnte auf der Zelloberfläche von U373-MG nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, läßt sich auf der Zelloberfläche von Fibroblasten reichlich gB detektieren, was einen wesentlichen und wichtigen Unterschied zwischen den beiden Zellarten darstellt, denn hier ist in HCMV-infizierten U373-MG ein wichtiger Schritt im zytoplasmatischen Umhüllungsprozeß der Nukleokapside gestört.

Da die Permissivität stark vom Grad der Differenzierung abhängig ist (Gonczol et al., 1984), ist auch eine wesentliche Frage, welchen Differenzierungsgrad die Astrozytom-Zelllinie U373-MG besitzt. Weber (1998) hat diesbezüglich den Differenzierungsgrad der Zelllinie durch Immunfluoreszent-Anfärbung des Differenzierungsmarkers „saures Gliaprotein“ (Glial Fibrillar Acidic Protein, GFAP) bestimmt und konnte zeigen, daß nur 58% der Zellen der von uns verwendeten Zelllinie für das saure Gliaprotein positiv waren und somit nur 58% einen hohen Differenzierungsgrad hatten. Die übrigen Zellen exprimieren dieses Zytoskelettprotein nicht, d.h. wir arbeiteten mit einer heterogenen Population von Zellen. Aber auch die direkt von ATCC (American Tissue and Culture Collection) bezogene U373-MG Zelllinie zeigte einen ähnlichen Differenzierungsgrad. Setzt man diesen Anteil mit dem Anteil der IE-positiven Astrozytom-Zellen in Beziehung, findet sich eine deutliche Übereinstimmung zwischen differenzierten Astrozytom-Zellen und der Fähigkeit der Zellen, Proteine der α -Phase (IE) zu synthetisieren.

Verfolgt man nun den Infektionszyklus vom Eindringen des Virus in die Wirtszelle bis hin zur Freisetzung reifer Viruspartikel, gibt es viele Möglichkeiten eines gestörten Infektionszyklus.

Die erste Frage, die sich stellt, ist, ob nur die IE-positiven Astrozytom-Zellen infiziert wurden, oder ob die Viren jede Astrozytom-Zelle infizieren können, dann aber, möglicherweise differenzierungsabhängig, der weitere Transport der eingedrungenen Viruspartikel mit Hilfe von Mikrotubuli (Sodeik et al., 1997) blockiert ist.

Ein Rezeptor, der das Eindringen des humanen Zytomegalievirus in die Wirtszelle vermittelt, wurde noch nicht eindeutig identifiziert. Bisher wurde nur ein 30 kDa und ein 92 kDa Membran-Protein als wahrscheinlicher Rezeptor nachgewiesen (Keay et al. 1989, Taylor & Cooper, 1990). In diesem Zusammenhang wäre interessant, ob der Rezeptor auf der Zelloberfläche aller Astrozytom-Zellen zu finden ist, oder nur auf dem hochdifferenzieren Anteil der U373-MG Kultur. Es wurden einige Zelllinien hinsichtlich Expression dieser beiden potentiellen Rezeptoren untersucht (Nowlin et al., 1991), allerdings wurde U373-MG diesbezüglich nicht getestet.

Der erste Block besteht also darin, daß nur etwa 50% der Zellen einer infizierten U373-MG Kultur mit der Virusreplikation beginnen, jedoch ist nicht geklärt, ob das Virus aufgrund eines Rezeptormangels bei etwa 50% der Astrozytoma-Zellen nicht in die Zelle eindringen kann, ob es unmittelbar nach dem Eindringen des Virus zu einem sogenannten „Post-Penetrationsblock“ kommt, oder ob der Mikrotubuli-assoziierte Transport der eingedrungenen Viren gestört ist.

Nachdem das Nukleokapsid in den Zellkern eingedrungen ist, beginnt die Replikation der DNA. Dies geschieht, wie bei allen Herpes-Viren, als sogenannter „rolling-circle“. Dabei wird die ursprünglich linear im Kapsid vorliegende Virus-DNA zirkularisiert. Bei der DNA-Replikation entsteht ein sogenanntes Concatemer, also eine fortlaufende Kette aneinanderhängender Virus-Genome. Anschließend wird diese Kette in einzelne Virus-Genome gespalten und in Kapside verpackt. Über die Zirkularisierung bzw. das auseinander schneiden ist nur wenig bekannt. Die Zirkularisierung der Virus-DNA ist dabei Enzym-unabhängig, also auch unabhängig von der Wirtszelle (McVoy et al., 1994).

Eine frühe Blockierung der Virusreplikation bzw. Infizierbarkeit könnte sich allerdings auch im Kern infizierter Astrozytom-Zellen abspielen, denn es ist bekannt, daß zahlreiche zelluläre Faktoren, wie z.B. Rb, p53, ATF und eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren, eine wichtige Rolle bei der Initiation der viralen Genexpression spielen (Spector, 1996). Insbesondere hier könnte der Grad der Differenzierung eine wesentliche Bedeutung bei der Initiation der viralen Genexpression haben.

Nach dem Eindringen der Viren in den Zellkern kommt es zur Aktivierung der viralen Genexpression, die von verschiedenen zellulären und auch viralen Faktoren wie dem Tegumentprotein pp71 (Transaktivator) abhängig ist. (Spector, 1996, Colberg-Poley, 1996, Stenberg, 1996). Dieser komplexe Regulationsmechanismus könnte in U373-MG blockiert sein, so daß die Viren den Zellkern zwar erreichen, aber aufgrund zellulärer Transkriptionsfaktoren, differenzierungsabhängig, nicht mit der Expression viraler Gene beginnen können. Fraglich ist auch, ob die viralen Transkriptionsfaktoren (pp71) den Zellkern infizierter Astrozytom-Zellen erreichen.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, daß nur ca. 50% der infizierten Astrozytom-Zellen mit der α -Phase (IE) der viralen Genexpression beginnen. Die Daten einer Arbeit von Dulcos et al. (1989) zeigen allerdings, daß 100% der Astrozytom-Zellen nach Infektion mit HCMV mit der Expression viraler Gene der α -Phase beginnen.

Eine Untersuchung zur Latenz der HCMV-Infektion in unterschiedlichen Zelllinien zeigt, daß die Latenz mit der fehlenden Translation der IE2 mRNA assoziiert ist. In diesem System wurde U373-MG ebenfalls getestet, zeigte aber nicht die Fähigkeit zur latenten Infektion (Wolff et al., 1994). Dennoch wäre interessant, ob es bei den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten U373-MG Zellen einen Zusammenhang zwischen der Proteinsynthese von IE2 und der Expression später viraler Proteine gibt, bzw. ob alle IE-positiven Zellen beide Proteine, IE1 und IE2, synthetisieren. Da hier ein Antikörper verwendet wurde, der beide IE-Proteine gleichzeitig detektiert, ließ sich dies nicht differenzieren. Somit läßt sich hier keine Aussage zur latenten Infektion von einem Teil der Astrozytom-Zellen machen.

In einer anderen Arbeit (Wu et al., 1997) wurde die Rolle der immediate early-Genprodukte, insbesondere IE1 und IE2 untersucht. Es zeigte sich, daß die Synthese von IE2 für die Genregulation von besonderer Bedeutung ist, denn die Expression

von IE2 ist die Voraussetzung für die Überleitung in die early-Phase (β -Phase), wohingegen IE1 nur eine synergistische Funktion erfüllt. IE2 bildet mit dem zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 einen spezifischen Protein-DNA-Komplex, der an ein „inverted-repeat element (IR1)“ bindet, und so den Promotor der viralen DNA-Polymerase (UL54) aktiviert. Die Zellspezifität des *humanen Zytomegalievirus* wird durch eine noch nicht bekannte Repressor-Aktivität bestimmt, die die Bildung des Komplexes am Promotor inhibiert. Diese Experimente wurden mit U373-MG Zellen durchgeführt, jedoch beruhen die Ergebnisse auf Transfektionsexperimenten.

Möglicherweise exprimiert ein Teil der hier verwendeten U373-MG Zellen diese Repressor-Aktivität, so daß zwar IE2 synthetisiert wird, aber nicht den Promotor der viralen DNA-Polymerase aktivieren kann. Aus diesem Grund wäre interessant zu untersuchen, ob ein Teil dieser Zellen IE2 synthetisieren kann, aber durch einen Repressor die weitere Expression viraler Gene unterdrückt wird, oder aber ob diese Zellen IE2 nicht synthetisieren und somit latent infiziert sind.

Ahn et al. (1997) haben gezeigt, daß die beiden major immediate-early Genprodukte IE1 und IE2 bestimmte nukleäre Verteilungsmuster annehmen und dadurch zu einer Umverteilung oder Auflösung punktförmiger nukleärer Strukturen führen. Bei diesen Strukturen handelt es sich um ND10 (nuclear dot domains) oder PODs (PML oncogenic domains), die unterschiedliche zelluläre Proteine wie SP100 oder „PML proto-oncogenic product“ enthalten.

In der frühesten Phase der Infektion kommt es im Zellkern transient zu einer Kolo-kalisation von IE1 und den in den punktförmigen Strukturen befindlichen Proteine PML und SP100. Später wird diese punktförmige Verteilung aufgehoben, und es kommt zu einer diffusen nukleären Verteilung von IE1 und SP100 bzw. PML. IE2 kolo-kalisiert ebenso mit PODs, im Gegensatz zu IE1 bleibt die punktförmige nukleäre Verteilung von IE2 aber erhalten, auch wenn sich die beiden Proteine SP100 und PML umverteilen.

Diese Verteilungsmuster scheinen dabei unabhängig von einer Infektion mit HCMV zu sein, denn die Umverteilungen finden sowohl in HCMV-infizierten Fibroblasten als auch in Transfektionsexperimenten mit permissiven U373-MG und nicht permissiven Vero-Zellen statt. Ahn et al. gehen davon aus, daß diese nukleären Umverteilungen bzw. Lokalisationen, für einen lytischen Infektionszyklus von großer Bedeutung sind. Allerdings wurde nicht gezeigt, ob diese nukleären

Umverteilungen für den weiteren Replikationszyklus notwendig sind. In Bezug auf U373-MG wäre es interessant, ob diese Veränderungen einen Einfluß auf die weitere Replikation haben, in dem man die Verteilungsmuster von IE1 und IE2 in Beziehung setzt zur Expression später viraler Proteine.

Da der major immediate-early Promoter (MIEP) sich in verschiedenen lymphoiden Zelllinien durch zyklisches AMP (cAMP) aktivieren läßt, wurde diese Eigenschaft bei verschiedenen Zelllinien des zentralen Nervensystems getestet, wobei sich der Promoter (MIEP) durch Zugabe von dbcAMP (dibutyryl cyclic AMP) in der humanen Neuroblastom Zelllinie IMR-32 aktivieren ließ, jedoch nicht in der Gliom-Zelllinie 118MGC und U373-MG (Sadanari et al., 1999), so daß sich durch Zusatz von dbcAMP die Virusproduktion in U373-MG nicht erhöhen läßt. Die Arbeit zeigt auch, daß bei einer Infektionsdosis (MOI) von 1 nur 58% der Astrozytom-Zellen IE-positiv sind, was mit den hier präsentierten Ergebnissen übereinstimmt. Allerdings ließ sich dieser Wert mit einer MOI von 10 auf 100% erhöhen, was wiederum im Gegensatz zu meinen Ergebnissen steht, denn eine Dosiserhöhung führte nicht zur Zunahme der IE-positiven Zellen.

Der nächste Schritt der Virusreplikation besteht im Zusammenbau der Nukleokapside und der Verpackung der viralen DNA. Dieser Prozeß findet im Zellkern statt. Hierfür sind die vier Kapsidproteine major capsid protein (MCP), minor capsid protein (mCP), das mCP-bindende Protein (mC-BP) und das smallest capsid protein (SCP) notwendig (Gibson 1996). Diese Strukturproteine werden in der späten γ -Phase der viralen Genexpression synthetisiert. Die Immunfluoreszenz-Experimente meiner Arbeit zeigen, daß nur ca. 30% der infizierten Astrozytom-Zellen (IE-positiv) auch Strukturproteine (pp150-positiv) synthetisieren. In der Arbeit von Dulcos et al. (1989) synthetisieren etwa 50% der infizierten U373-MG späte Strukturproteine. Lichtmikroskopisch läßt sich dies bereits am zytopathischen Effekt und der Ausprägung der Skein-Struktur im Zellkern erkennen. Ultrastrukturell zeigen sich in den Skein-Strukturen der Astrozytom-Zellen auch zahlreiche Nukleokapside. Der Verpackungsprozeß der viralen DNA ist noch weitgehend unbekannt, jedoch könnte auch hier ein weiterer Defekt der Astrozytom-Zelllinie in der Virusmorphogenese liegen, denn die Titrations messen nur die infektiösen, aber nicht die nicht-infektiösen (NIEP) Viruspartikel, so daß die Titrations nur einen niedrigen Titer vortäuschen könnten, tatsächlich aber zahlreiche NIEPs freigesetzt

werden. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse sprechen allerdings dagegen, denn im Zellkern finden sich DNA-haltige Nukleokapside.

Der Durchtritt der Nukleokapside durch die Kernlamina ist der darauf folgende Schritt der Virusmorphogenese. Hierzu wird die Kernlamina fokal sowohl in der Struktur als auch biochemisch verändert. Es kommt zu einer fokalen Verdickung der Kernlamina und zur Dephosphorylierung der Lamine A und C (Radsak et al., 1991). Dies könnte eine weitere Störung im Transport der Nukleokapside aus dem Zellkern in das Zytoplasma in infizierten U373-MG darstellen, jedoch findet sich keine Akkumulation von Nukleokapsiden im Zellkern von infizierten U373-MG, die man dann erwarten würde. Es lassen sich Nukleokapsid-Durchtritte durch die Kernlamina beobachten und auch im Zytoplasma findet man Nukleokapside, allerdings im Vergleich zu infizierten Fibroblasten in deutlich geringerer Menge. Jedoch lassen sich in Zellkernen produktiv infizierter Astrozytom-Zellen viele elektronendichte runde Strukturen erkennen, sogenannte nukleäre „dense bodies“, deren Bedeutung noch unklar ist. Man vermutet, daß sie, zumindest in Fibroblasten, Ausdruck eines stimulierten zellulären Metabolismus sind, jedoch findet man im Vergleich zu Astrozytom-Zellen wesentlich weniger nukleäre „dense bodies“ (Severi et al., 1991). Vielleicht sind die in infizierten Astrozytom-Zellen teilweise sehr stark ausgeprägten nukleären „dense bodies“ auch das Ergebnis vom Abbau von Nukleokapsiden, so wie die zytoplasmatischen „dense bodies“ vermutlich an der Elimination überflüssiger viraler Bestandteile beteiligt sind.

Die in dieser Arbeit gemessene Virusfreisetzung bestimmt nur die Menge infektiöser Viren, nicht jedoch die nicht infektiösen Partikel (NIEP), denen das virale Genom fehlt. So ist fraglich, ob U373-MG generell weniger Viren freisetzt oder nur sehr viel weniger infektiöse Viren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten allerdings nicht auf ein Überwiegen von NIEPs hin, sondern zeigen generell eine sehr geringe Virusfreisetzung. Im Vergleich zu anderen Arbeiten (Reis et al., 1993, Kari et al., 1992) ist die hier gemessene Virusfreisetzung jedoch deutlich geringer.

Im Gegensatz dazu steht wiederum eine Arbeit von Ripalti et al. (1994), in der Virustitrationen durchgeführt wurden. Die Virustiter waren in den ersten 10 Tagen, etwas abhängig von der Virusdosis, sehr gering und entsprechen den Ergebnissen

meiner Arbeit. Allerdings zeigen die Autoren gleichzeitig, daß der Virustiter erst sehr spät nach Infektion ansteigt und ab 10 Tagen nach Infektion hohe Werte erreicht. Der Unterschied zu dieser Arbeit besteht jedoch darin, daß nicht mit dem von uns verwendeten Virusstamm Ad169, sondern mit Town und U373-MG-Subklonen gearbeitet wurde.

In einer Arbeit von Kari et al. (1992) wurden sowohl die intrazellulären Viren als auch die freigesetzten Viruspartikel titriert. So wurden die Viruspartikel in U373-MG im Zytoplasma zurückgehalten und nur ein geringer Teil (23%, 7 d p.i.) freigesetzt. Im Gegensatz dazu werden von den Fibroblasten fast alle Viren freigesetzt (88%, 7 d p.i.), wobei gleichzeitig die gesamte Virusmenge in Fibroblasten viel höher ist. Die Arbeit zeigt ebenso, daß in U373-MG die viralen Glykoproteine anders posttranslational prozessiert werden und im Vergleich zu Fibroblasten weniger stark O-glykosyliert sind, was ein Grund für die geringe Virusfreisetzung sein könnte.

Allan-Yorke et al. (1997) konnten nachweisen, daß sich die Produktion von Viruspartikeln um den Faktor 6 durch Zugabe von einem kurzkettigen Lipid (C6-Ceramid) in infizierten U373-MG Zellen steigern läßt. Die Wirkungsweise der kurzkettigen Ceramide ist jedoch unbekannt. Auch die Expression von gB ließ sich deutlich steigern. Hierbei wurde allerdings nur die Menge intrazellulärer Viruspartikel titriert, und nicht die Menge freigesetzter Viren. Interessant wäre, ob sich durch Zugabe dieses Lipids auch die Virusfreisetzung steigern läßt, was in der Arbeit aber nicht getestet wurde.

Bezieht man sich nun nur auf die Astrozytom-Zellen, die für die immediate early-Genprodukte IE1 und IE2 positiv sind, und setzt diesen Anteil in Beziehung zu dem Anteil der Astrozytom-Zellen, die gleichzeitig für späte Genprodukte (pp150) positiv sind, wird eine weitere Blockade in der Virusreplikation deutlich, denn nur ein geringer Anteil der IE-positiven Zellen (27%) exprimiert späte Proteine. Hier liegt also eine zweite Blockade in der Virusreplikation bzw. Expression viraler Gene. Auch diese Blockade könnte auf den Differenzierungsgrad bzw. zelluläre Faktoren zurückzuführen sein. Die Immunfluoreszenz-Ergebnisse dieser Arbeit, also der Anteil immediate early- und late-Protein positiver U373-MG-Zellen stimmt mit den Ergebnissen von Weber (1998) überein. Eine andere Arbeit von Dulcos et al. (1989)

weicht allerdings deutlich von den hier dargestellten Ergebnissen ab, denn in dieser Arbeit waren nahezu 100% der U373-MG-Zellen für early-Genprodukte 18 Stunden nach Infektion positiv. Allerdings erwies sich auch hier, daß 72 h p.i. nur ca. 50% dieser infizierten Zellen für späte Genprodukte positiv waren. In dieser Arbeit von Dulcos würde zwar mit einer höheren Infektionsdosis gearbeitet (MOI 5), jedoch ließ sich bei meinen Experimenten auch mit hohen Infektionsdosen der Anteil der IE-positiven U373-MG nie auf Werte über 55% steigern.

In einer Arbeit von Ripalti et al. (1994) sind wiederum 100% der infizierten Astrozytom-Zellen 12 h p.i. IE-positiv und sogar zu fast 100% positiv für virale DNA 144 h p.i., wobei die virale DNA durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen wurde.

Die unterschiedlichen Infizierbarkeiten von U373-MG, die von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde, weichen deutlich voneinander ab. Es ist bekannt, daß Zimortzellinien sich mit fortschreitender Passage biologisch verändern, so daß die verschiedenen Ergebnisse darauf zurückzuführen sind.

Denkbar wäre auch eine als Reaktion auf die Infektion bedingte Freisetzung von löslichen antiviralen Substanzen in der U373-MG Kultur. Wenn man jedoch sowohl Fibroblasten als auch U373-MG vor einer Infektion mit den Überständen infizierter U373-MG präinkubiert, zeigen sich hinsichtlich der Virusreplikation bzw. Freisetzung keine antiviralen Effekte der Überstände (Meyer et al., 1997).

Allein anhand der Immunfluoreszenz-Daten läßt sich jedoch die sehr geringe Virusfreisetzung nicht erklären. Setzt man voraus, daß die 15% der produktiv infizierten, also pp150-positiven Astrozytoma-Zellen, im gleichen Maße Viruspartikel synthetisieren und auch Freisetzen, wie die Fibroblasten dies tun, wäre der Virustiter sehr viel höher als er tatsächlich ist. Aufgrund dessen müssen zusätzlich Schritte im Reifungsprozeß in U373-MG gestört sein.

Eigene Ergebnisse zeigen eine gestörte Reifungsknospe: Der zytoplasmatische Umhüllungsprozeß durch das frühe Endosom und die Freisetzung der Viruspartikel ist in U373-MG deutlich schwächer ausgeprägt. Eine Arbeit von Kari et al. (1992) weist darauf hin, daß die Virusfreisetzung in U373-MG deutlich reduziert ist und es

zu einer Retention bereits umhüllter Viruspartikel kommt. Im Vergleich dazu ist die Virusproduktion in humanen Fibroblasten insgesamt stärker, wobei die Viren fast vollständig freigesetzt werden. Diese Untersuchungen basieren allerdings nur auf Titrationsexperimenten, insbesondere Titration von intrazellulären, infektiösen, umhüllten Viruspartikel, ohne licht- oder elektronenmikroskopische Untersuchungen, die eine Retention der Viruspartikel im Zytoplasma direkt nachweisen können.

Eigene elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen jedoch keine großen Ansammlungen von reifen Viruspartikeln im Zytoplasma von U373-MG.

Die Hauptaussage dieser Arbeit von Kari et al. ist jedoch, daß die posttranslationale Modifizierung der viralen Glykoproteine in U373-MG im Vergleich zu humanen Fibroblasten verändert ist., wobei die viralen Glykoproteine eine im Vergleich zu Fibroblasten geringere O-Glycosylierung aufweisen. Dies könnte ein möglicher Grund für die reduzierte Freisetzung von Viruspartikeln sein.

In eigenen Experimente wurde die Expression vom viralen Glykoprotein gB auf der Zelloberfläche dargestellt. Hier war ein sehr deutlicher Unterschied zwischen humanen Fibroblasten und U373-MG erkennbar. Während humane Fibroblasten deutliche punktförmige Immunfluoreszenz-Signale auf der Zelloberfläche zeigen, ließ sich mit dieser Methode kein gB auf der Zelloberfläche von U373-MG nachweisen, wohingegen die intrazelluläre Verteilung von gB der von humanen Fibroblasten entspricht. Die vorübergehende Expression und anschließende Reinternalisierung wurde von Radsak et al. (1996) an humanen Fibroblasten nachgewiesen und ist für die Reifungsknospung und Virusfreisetzung von entscheidender Bedeutung. Wenn nun der intrazelluläre Transport von gB über den Golgi-Komplex zur Zelloberfläche bei U373-MG gestört ist, kann gB wahrscheinlich auch nicht zum frühen Endosom gelangen, wo es für den Umhüllungsprozeß notwendig ist. Dies würde die beobachtete reduzierte Umhüllung und Freisetzung in infizierten Astrozytom-Zellen erklären.

Andere Untersuchungen bestätigen die Beobachtung, daß gB nicht auf der Zelloberfläche HCMV-infizierter U373-MG und Monozyten/Makrophagen detektiert werden kann und die produzierten Viren ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszellen verbleiben (Fish et al., 1995).

Beim Transport der viralen Glykoproteine werden, wie im sekretorischen Weg üblich, die sekretorischen Proteine phosphoryliert. Die einzige Phosphorylierungsstelle für gB ist Serin₉₀₀, die entsprechende Kinase ist die Casein Kinase II. Bezüglich der Phosphorylierung von gB gibt es keine Unterschiede zwischen humanen Fibroblasten und U373-MG (Fish et al., 1998). Durch den Austausch von Ser₉₀₀ gegen eine geladene Aminosäure (Asparaginsäure) und Infektion mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus mit entsprechenden gB-Mutationen oder wild-typ gB läßt sich gB auf der Oberfläche von U373-MG detektieren. Ebenso führt der Phosphatase-Inhibitor Tautomycin zu einer Akkumulation von wild-typ gB auf der Zelloberfläche von U373-MG, hat aber keinen Einfluß auf humane Fibroblasten. Schließlich führt eine mit Vaccinia-Virus transfizierte Dynamin-Mutation zur Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose und zur Akkumulation von gB auf der Zelloberfläche von U373-MG. Zusätzlich zeigen Antikörper-Uptake-Experimente, das wild-typ gB bei der Astrozytoma-Zelllinie schnell reinternalisiert wird und anschließend intrazellulär mit Vakuolen assoziiert ist. Diese Experimente zeigen also, daß gB von U373-MG zwar auf die Zelloberfläche transportiert wird und die Expression von gB auf der Zelloberfläche vom Phosphorylierungsstatus von Serin₉₀₀ abhängig ist. Allerdings wird gB von U373-MG sehr schnell Clathrin-abhängig reinternalisiert, so daß es mit Immunfluoreszenz-Experimenten nicht nachweisbar ist.

Die Frage, was mit dem reinternalisieren gB geschieht, ist allerdings nicht geklärt. Zu bedenken ist jedoch, daß die Versuche mit rekombinanten Vaccinia-Viren durchgeführt wurden, und somit der komplexe Replikationszyklus von HCMV mit Umstrukturierungen des Zytoplasmas, wie die Umverteilung des Golgi-Komplexes, keine Berücksichtigung findet.

Allerdings zeigt Reis et al. (1993), daß U373-MG zur Expression von gB auf der Oberfläche fähig ist. Hierfür wurde gB in U373-MG stabil transfiziert. Diese Beobachtung könnte durch die Überexpression von gB zu erklären sein.

Bestimmte Mutationen von gB in der hydrophoben Transmembrandomäne, nämlich eine Deletion von Aminosäure 717 bis 747 oder ein Austausch dreier Aminosäuren im Bereich 748 bis 750 führen dazu, daß gB nicht mehr zur Zelloberfläche transportiert wird, sondern im rauen endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird, während die Deletionen der Aminosäuren 751 bis 771 oder 717 bis 772 zur

Sekretion von gB führt, denn die Transmembrandomäne wurde entfernt. Ursache der Retention im rauhen endoplasmatischen Retikulum sind die beiden Chaperone GRP78 und GRP94, die transient sowohl zytoplasmatische als auch virale Glykoproteine binden. Diese beiden Chaperone spielen eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung von gB und die Deletionen führen so zur Retention im rauhen endoplasmatischen Retikulum durch GRP78 und GRP94, ohne daß gB degradiert wird (Zheng et al., 1996). Diese Ergebnisse beruhen ebenfalls ausschließlich auf Transfektionsexperimenten mit U373-MG, aber dennoch stellt das Ergebnis einen weiteren potentiellen Defekt in HCMV-infizierten U373-MG dar, in dem möglicherweise die Interaktion von gB mit den Chaperonen gestört ist.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Astrozytom-Zelllinie U373-MG, die häufig für Transfektionsexperimente zur Untersuchung der Funktion einzelner oder mehrerer Proteine des *humanen Zytomegalievirus* für die Morphogenese des Virus benutzt wird, nur bedingt dafür geeignet ist. Der Grund dafür ist die sehr geringe Virusfreisetzung, die auf mehrere Defekte in der Virusreplikation bzw. Virusmorphogenese zurückzuführen ist. Der erste Defekt besteht darin, daß nur ca. 50% der Zellen die sehr frühen (immediate-early, IE) Proteine der Replikation nach Infektion exprimieren, wobei nicht klar ist, ob das Virus die restlichen Zellen auf Grund eines Rezeptormangels nicht infizieren kann oder ob das Virus in die Zelle eindringt und die anschließende Virusreplikation intrazellulär blockiert wird.

Ein zweiter Grund für die geringe Virusreplikation in U373-MG ist, daß nur ein geringer Anteil der IE-exprimierenden Zellen virale DNA und späte virale Strukturproteine für die Virusmorphogenese synthetisiert.

Die Zellen, die späte virale Proteine (pp150) synthetisieren, also ca. 14% der IE-positiven Zellen, produzieren Viruspartikel, die elektronenmikroskopisch zahlreich im Zellkern, weniger zahlreich im Zytoplasma nachweisbar sind.

Ein dritter Defekt findet sich in der späten Phase der intrazellulären Umhüllung der Viruspartikel. Hier ließen sich mit Immunfluoreszenzexperimenten keine viralen Glykoproteine (gB) auf der Zelloberfläche produktiv infizierter Astrozytom-Zellen nachweisen. Die vorübergehende Expression von viralen Glykoproteinen auf der Zelloberfläche spielt bei dem Umhüllungsprozeß am frühen tubulären Endosom eine wesentliche Rolle.

Die geringe Virusfreisetzung könnte somit insbesondere auf diesen Defekt im letzten Schritt der Virusmorphogenese zurückzuführen sein.

Die Arbeit hat auch gezeigt, daß die Zelllinie U373-MG inhomogen ist. Die Zellen weisen unterschiedlich starke Differenzierungsgrade auf, wobei ein hoher Differenzierungsgrad wesentliche Voraussetzung für die Replikation des *humanen Zytomegalievirus* ist. Ob allerdings ein hoher Differenzierungsgrad der Zelllinie tatsächlich auch die vollständige Virusmorphogenese bis zur Freisetzung der Viruspartikel erlaubt, bleibt fraglich. Bisher ist es nicht gelungen, die Zelllinie soweit

zu differenzieren, daß die Virusmorphogenese mit der von humanen Fibroblasten vergleichbar wäre.

7 Literaturverzeichnis

Ahn J-H & Hayward G S (1997).

The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early time in infected permissive cells. *J. Virol.* 71(6); 4599-4613

Allan-Yorke J, Record M, De Préval C, Davrinche C & Davignon J-L (1997).

Distinct pathways for tumor necrosis factor alpha and ceramides in human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 72(3); 2316-2322

Arcangeletti M C, Pinardi F, Medici M C, Pilotti E, De Conto F, Ferraglia F, Landini M P, Chezzi C & Dettori D (2000)

Cytoskeleton involvement during human cytomegalovirus replicative cycle in human embryo fibroblasts. *New Microbiol.* Jul;23(3):241-56

Baldick C J Jr. & Shenk T (1996).

Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* 70; 6097-6105.

Bankier A T, Beck S, Bohni R, Brown C M, Cerny R, Chee M S, Hutchinson C A, Kouzarides T, Martignetti J A, Preddie E, Satchwell S C, Tomlinson P, Weston K M & Barrell B G (1991).

The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq* 2; 1-12.

Battista M C, Bergamini G, Boccuni M C, Campanini F, Ripalti A & Landini M P (1999).

Expression and characterisation of a novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25. *J. Virol* 73(5); 3800-3809

Beaudet-Miller M, Zhang R, Durkin J, Gibson W, Kwong A D & Hong Z (1996).

Virus-specific interaction between human cytomegalovirus major capsid protein and the c terminus of the assembly protein precursor. J. Virol 70; 8081-8088

Bogner E, Reschke M, Reis T, Mockenhaupt T & Radsak K (1993).

Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus. Virology 196; 290-293

Bold S, Ohlin M, Garten W & Radsak K (1996).

Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. J. Gen. Virol. 77; 2297-2302

Boldogh I, AbuBakas S & Albrecht T (1990).

Activation of proto-oncogenes: An immediate early event in human cytomegalovirus infection. Science 247; 561-564

Brand G, Kern H F & Hensel G M (in Vorbereitung).

Human cytomegalovirus (HCMV) infection of human fibroblasts leads to spatial reorganisation of early endosom and Golgi cisternae.

Bresnahan W A ,Boldogh I, Thompson E A & Albrecht T (1996).

Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. Virology 224; 150-160

Bresnahan W A and Shenk T (2000).

A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. Science 288; 2373-2376

Britt W J & Alford C A (1996).

Fields Virology, S. 2493-2523. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et. al. Lippincott - Raven Press, Philadelphia.

Britt W J & Mach M (1996).

Human cytomegalovirus glycoproteins. Intervirology 39; 401-412

Butcher S J, Aitken J, Mitchell J, Gowen B & Dargan D J (1998).

Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. J. Struct. Biol. 124; 70-76

Chee M S, Bankier A T, Beck S, Bohni R, Brown C M, Cerny R, Horsnell T, Hutchinson C A, Kouzarides T, Martignetti J A, Preddie E, Satchwell S C, Tomlinson P, Weston K M & Barrell B G (1990).

Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154; 125-169.

Chen D H, Jiang H, Lee M, Liu F & Zhou Z H (1999).

Three-dimensional visualization of Tegument/Capsid interaction in the intact human cytomegalovirus. Virology 260(1); 10-16

Cinatl J Jr, Cinatl J, Vogel J U, Rabenau H, Kornhuber B & Doerr H W (1996).

Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. Intervirology 39(4); 259-269

Colberg-Poley A M (1996).

Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus UL36-38, UL115-119, TRS1/IRS1 and US3 loci. Intervirology 39; 350-360

Compton T, Dawn M N & Cooper N R (1993).

Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. Virology 193; 834-841

Compton T, Nepomuceno R R & Nowlin D M (1992).

Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. Virology 191; 387-395

Compton T (1993).

An immortalized human fibroblast cell line is permissive for human cytomegalovirus infection. J. Virol. 67(6); 3644-3648

Doniger J, Muralidhar S & Rosenthal L J (1999)

Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transaktivieren. Clin. Microbiol. Rev. 12(3); 367-382

Dulcos H, Elfassi E, Michelson S, Arenzana-Seisdedos F, Munier A & Virelizier J L (1989).

Cytomegalovirus infection and trans-activation of HIV-1 and HIV-2 LTRs in human astrocytoma cells. AIDS res 5; 217-224

Fish K N, Soderberg-Naucler C & Nelson J A (1998).

Steady-state plasma membrane expression of human cytomegalovirus gB is determined by the phosphorylation state of Ser₉₀₀. J. Virol 72(8); 6657-6664

Fish K N, Depto A V, Moses W, Britt W & Nelson J A (1995).

Growth kinetics of human cytomegalovirus are altered in monocyte-derived macrophages.

J. Virol 69; 3737-3743

Fowler K B, Stagno S, Pass R F (1992)

The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status.

N Engl J Med; 326:663-667

Gibson W (1996).

Structure and assembly of the virion. Intervirology 39; 389-400

Gonczol E, Andrews P W, Plotkin S A (1984).

Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. Science 224; 159-161

Hensel G, Meyer H, Gärtner S, Brand G & Kern H F (1995).

Nuclear Lokalisation of the human cytomegalovirus tegument protein pp150 (ppUL32).
J. Gen Virol 76; 1591-1601

Irmiere A & Gibson W (1983).

Isolation and characterisation of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strain of cytomegalovirus. Virology 130; 118-133

Jacobson M A, Mills J (1988).

Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Ann Intern Med; 108: 585-594

Liu B & Stinski M F (1992).

Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. J Virol. 66; 4434-4444.

Kari B, Radeke R & Gehrz R (1992).

Processing of human cytomegalovirus envelope glycoproteins in and egress of cytomegalovirus from human astrocytoma cells. J. Gen. Virol. 73; 253-260

Kaye J F, Gompels U A & Minson A C (1992).

Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with HCMV UL115 gene product. J. Gen. Virol. 73; 2693-2698

Keay S, Merigan T C, & Rasmussen L (1989).

Identification of cell surface receptors for the 86-kilodalton glycoprotein of human cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86; 10100-10103

Keay S & Baldwin B (1991).

Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. J. Virol. 65; 5124-5128

Kim K S, Sapienza V J, Carp R I, Moon H M (1976).

Analysis of structural polypeptides of purified human cytomegalovirus. J. Virol. 20; 604-611

Knowles W A (1976).

In-vitro cultivation of human cytomegalovirus in thyroid epithelial cells. Arch. Virol. 50; 119-124

LaFemina R & Hayward G S (1986).

Constitutive and retinoic acid-inducible expression of cytomegalovirus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells. J. Virol. 58(2); 434-440

Lang D J (1975).

The epidemiology of cytomegalovirus infections. In: Krugman S, Gershon A A. Infections of the fetus and newborn infant. New York: Alan R. Liss; 35-45

Lathey J, Wiley C A, Verity M A & Nelson J A (1990).

Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus. Virology: 176; 266-273

Leland D S & French M L (1988).

Virus Isolation and Identification. In Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases, S. 40-59. E. H. Lennette, P. Halonen & F. A. Murphy (Ed.). New York: Springer-Verlag.

Liu B, Stinski M F (1992).

Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. J. Virol 66; 4434-4444

Mansueti L & Shenk T (1998).

Human cytomegalovirus UL69 Protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. J. Virol 73(1); 676-683

McGavran M H, Smith M G (1965).

Ultrastructural, cytochemical and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol* 4:1-10

McVoy M A & Adler S P (1994).

Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularisation by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* 68(2): 1040-51

Meyer H H, Ripalti A, Landini M P, Radsak K, Kern H F & Hensel G (1997).

Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. *J. Gen. Virol.* 78; 2621-2631

Mocarski E S (1996).

Fields Virology, S. 2447-2492. B. N. Fields, D. M. Kniepe, P. M. Howley, et. al. Lippincott - Raven Press, Philadelphia.

Nowlin D M, Cooper N R & Compton T (1991).

Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J. Virol* 65; 3114-3121

Ohizumi Y, Suzuki H, Matsumoto Y, Mashuho Y & Numazaki Y (1992).

Neutralizing mechanisms of two human monoclonal antibodies against human cytomegalovirus glycoprotein 130/55. *J. Virol.* 73; 2705-2707

Oien N L, Thomsen D R, Wathen M W, Newcomb W W, Brown J C & Homa F L (1997).

Assembly of herpes simplex virus capsids using the human cytomegalovirus scaffold protein: critical role of the C terminus. *J. Virol* 71(2); 1281-91

Perot K (1992).

Primary chimpanzee skin fibroblast cells are fully permissive for human cytomegalovirus replication. *J. Gen. Virol* 73; 3281-3284

Plachter B, Nordin M, Wirgart B Z, Mach M, Stein H, Grillner L & Jahn G (1992).

The DNA-binding protein P52 of human cytomegalovirus reacts with monoclonal antibody CCH2 and associates with the nuclear membrane at late times after infection. *Virus Res* 24; 265-276.

Poland S D, Costello P, Dekaban G A & Rice G P (1990).

Cytomegalovirus in the brain: In vitro infection of human brain-derived cells. *J Infect Dis* 162; 1252-1262

Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hübinger A & Reschke M (1995).

Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch. Virol.* 141; 557-572

Radsak K, Brücher K & Georgatos S (1991).

Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur. J. Cell Biol* 54; 299-304

Radsak K, Kern H, Reis B, Reschke M, Mockenhaupt T & Eickmann M (1995).

Human Cytomegalovirus. Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins. In *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms* S. 295-312. Barbanti-Brodano, G. et al. Plenum Press, New York, 1995

Reis B, Bogner E, Reschke M, Richter A, Mockenhaupt T & Radsak K (1993).

Stable constitutive expression of glycoprotein b (gpUL55) of human cytomegalovirus in permissive astrocytoma cells. *J. Gen. Virol.* 74; 1371-1379

Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D & Ganem D (1996).

Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nature Medicine* 2; 342-346.

Ripalti A, Bocconi F, Campanini F & Landini M P (1994)

Cytomegalovirus-mediated induction of antisense mRNA expression to UL44 inhibits virus replication in an astrocytoma cell line: identification of an essential gene. J. Virol. 69(4); 2047-2057

Roizman B (1993).

The Family Herpesviridae. In The Human Herpesviruses, S. 1-9. B. Roizman, R. J. Whitley & c. Lopez (Ed.). New York: Raven Press

Roizman B & Sears A E (1996).

Herpes simplex viruses and their replication; in Fields B N, Knipe D M, Howley P M, Chanock R M, Melnick J L, Monath T P, Roizman B, Straus S E (eds): Virology, ed 3. Philadelphia, Lippincott-Raven, pp 2231-2295

Sadanari H, Yamada R, Tanaka J, Murayama T, Ohnishi K, Matsubara K & Fukuda S (1999).

The effect of cyclic AMP on expression of the major immediate-early genes and replication of human cytomegalovirus in human central nervous system cell lines. Arch. Virol. 144; 1015-1025

Salvant B S, Frotunato E A & Spector D H (1998).

Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. J. Virol. 72(5); 3729-3741

Sanchez V, Kenneth D G, Sztul E, Britt W J (2000).

Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. J. Virol 74(2); 975-986

Schmolke S, Kern H F, Drescher P, Jahn G & Plachter B (1995).

The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. J Virol 69(10); 5959-5968

Scholl S, von Hintenstern J, Borisch B, Traupe B, Bröker M & Jahn G (1988).

Prokaryotic expression of immunogenic polypeptides of the large phosphoprotein (pp150) of human cytomegalovirus. J Gen Virol 69; 1195-1204

Severi B, Landini M P, Cenacchi G, Zini N & Maraldi N M (1992).

Human cytomegalovirus nuclear and cytoplasmatic dense bodies. Arch Virol 123; 193-207

Severi B, Landini M P & Govoni E (1988).

Human cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. Arch. Virol. 98; 1195-1204

Sinclair J & Sisson P (1996).

Latent and persistent infection of monocytes and macrophages. Intervirology 39; 293-301

Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw A S, The T H & Jahn G (1995).

Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. J Gen Virol 76; 741-750

Smith, J D (1986).

Human cytomegalovirus: demonstration of permissive epithelial cells and nonpermissive fibroblastic cells in a survey of human cell lines. J. Virol. 60(2); 583-588

Sodeik B, Ebersold W & Helenius A (1997).

Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus.
J. Cell Biol. 136; 1007-1021

Spaete R S, Gehrz R C & Landini M P (1994).

Human cytomegalovirus structural proteins. Review article. J. Gen. Virol. 75; 3287-3308

Spaete R R, Perot K, Scott P I, Nelson J A, Stinski M F & Pachl C (1993).

Coexpression of truncated human cytomegalovirus gH with UL115 gene product or the truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gH to the cell surface. *Virology* 193; 853-861

Spector D H (1996).

Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39; 361-377

Speir E, Modali R, Huang E, Leon M B, Shawl F, Finkel T & Epstein S E (1994).

Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 256; 391-394

Spiller O B, Borysiewicz L K & Morgan B P (1997).

Development of a model for cytomegalovirus infection of oligodendrocytes. *J. Gen. Virol.* 78; 3349-3356

Stenberg R M (1996).

The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* 39; 343-349

Stagno S, Pass R F, Dworsky M E, Alford C A (1982).

Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. In: Knox GE. *Clinical obstetrics and gynecology*. Philadelphia: JB Lippincott 563-576

Stinski M F (1983).

Molekular biology of cytomegalovirus. In: Roizman B, eds. *Herpesviruses*. New York: Plenum; 67-113

Stinski M F (1976).

Human cytomegalovirus: Glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J. Virol.* 19; 594-609

Taylor H P & Cooper N R (1990).

The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 3 β -kilodalton membrane protein. J. Virol. 64; 2484-2490

Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K & Kern H (1993).

Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilise early endosome cisternae for their envelopes. Eur. J. Cell Biol. 118; 813-830

Trus B L, Gibson W, Cheng N & Steven A C (1999).

Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. J. Virol. 73; 2181-2192

Tugizov S, Wang Y, Qadri I, Navarro D, Maidji E & Pereira L (1995).

Mutated forms of human cytomegalovirus glycoprotein B are impaired in inducing syncytium formation. Virology 209; 580-591

Tumilowicz J J, Gawlik M E, Powell B B & Trentin J J (1985).

Replication of cytomegalovirus in human arterial smooth muscle cells. J. Virol. 56; 839-845

Vonka V, Anisimova E & Macek M (1967).

Replikation of cytomegalovirus in human epitheloid diploid cell line. Arch. Virol. 52; 283-196

Weber M (1998).

Vergleichende Untersuchung zur DNA-Replikation des humanen Zytomegalievirus bei Fibroblasten und Astrozytoma-Zelllinie U373MG. Dissertation

Weller T H (1971).

The cytomegaloviruses: ubiquitous agent with protean clinical manifestations. N Engl J Med 285:203-214

Wentworth B B & French L (1970).

Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. P.S.E.B.M.: 135; 253-258

Wolf D, Sinzger C, Drescher P, Jahn G & Plachter B (1994).

Reduced levels of IE2 gene expression and shutdown of early and late viral genes during latent infection of the glioblastoma cell line U138-MG with selectable recombinants of human cytomegalovirus. *Virology* 204; 101-113

Wood L J, Maxter M K, Plafker S M & Gibson W (1997).

Human cytomegalovirus capsid protein precursor (pUL80.5) interacts with itself and with the major capsid protein (pUL86) through two different domains. *J. Virol* 71(1); 179-190

Wright H T, Goodheart C R, Lielausis A (1964).

Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology* 23:419-424

Wu J, O'Neill J & Barbosa M S (1997).

Transkription factor Sp1 mediates cell-specific trans-activation of human cytomegalovirus DNA polymerase gene promoter by immediate-early protein IE86 in glioblastoma U373MG cells. *J. Virol.* 72; 236-244

Zheng Z, Maidji E, Tugizov S & Pereira L (1996).

Mutations in the carboxyl-terminal hydrophobic sequence of human cytomegalovirus glycoprotein B alter transport and protein chaperone binding. *J. Virol.* 70(11); 8029-8040

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

8.2 Danksagung

8.1 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Prof. Dr. H. **Amon**, Prof. Dr. R. **Arnold**, Prof. Dr. G. **Aumüller**, Prof. Dr. H.D. **Basler**, Prof. Dr. B. **Bauer**, Prof. Dr. M. **Beato**, Prof. Dr. R. **Berger**, Prof. Dr. A. **Berndt**, Prof. Dr. E. **Braun**, Prof. Dr. E. **Daume**, Prof. Dr. **Drenkhan**, Dr. G. **Emmons**, Prof. Dr. C. **Eschenbach**, Prof. Dr. H. **Fruhstorfer**, Prof. Dr. H. **Ganz**, Prof. Dr. D. **Gemsa**, Prof. Dr. A. **Geus**, Prof. Dr. B. **Göcke**, Prof. Dr. K. **Golenhofen**, Prof. Dr. L. **Gotzen**, Prof. Dr. A. **Gressner**, Prof. Dr. P. **Griss**, Prof. Dr. K.H. **Grzeschik**, Prof. Dr. A. **Habermehl**, Prof. Dr. R. **Hackenberg**, Prof. Dr. R. **Happle**, Prof. Dr. K. **Havemann**, Prof. Dr. R. **Hilgermann**, Prof. Dr. G. **Huffmann**, Prof. Dr. K. **Joseph**, Prof. Dr. H. **Karffarnik**, Prof. Dr. H.F. **Kern**, Prof. Dr. H. **Klein**, Prof. Dr. R. **Kleine**, Prof. Dr. F. **Kleinsasser**, Prof. Dr. H.D. **Klenk**, Prof. Dr. H.J. **Klose**, Prof. Dr. J. **Koolman**, Prof. Dr. H. **Koop**, Prof. Dr. W. **Krause**, Prof. Dr. V. **Kretschmer**, Prof. Dr. I.C. **Krieg**, Prof. Dr. P. **Kroll**, Prof. Dr. R.E. **Lang**, Prof. Dr. H. **Lange**, Prof. Dr. H.H. **Lauer**, Prof. Dr. H. **Lennartz**, Prof. Dr. W. **Lorenz**, Prof. Dr. R. **Lührmann**, Prof. Dr. B. **Maisch**, Prof. Dr. W. **Mannheim**, Prof. Dr. H.G. **Mannherz**, PD Dr. **Martin**, Prof. Dr. A. **Mazumdar**, Prof. Dr. H.D. **Mennel**, Prof. Dr. K.J. **Netter**, Prof. Dr. F. **Portig**, Prof. Dr. K. **Radsak**, Prof. Dr. H. **Remschmidt**, Prof. Dr. H. **Riedmiller**, Prof. Dr. **Rieger**, Prof. Dr. O. **Rienhoff**, Prof. Dr. M. **Rothmund**, Prof. Dr. D. **Schachtschabel**, Prof. Dr. H. **Schäfer**, Prof. Dr. P. **Schmidt-Rohde**, Prof. Dr. P. **Schmitz-Moorman**, Prof. Dr. K.D. **Schulz**, Prof. Dr. W.B. **Schwerk**, Prof. Dr. W. **Schüffel**, Prof. Dr. K.H. **Seifart**, Prof. Dr. Dr. **Seitz**, Prof. Dr. R. **Seitz**, Prof. Dr. H. **Seybarth**, Prof. Dr. W. **Slenczka**, Prof. Dr. G. **Sturm**, Prof. Dr. C. **Thomas**, Prof. Dr. K. **Unsicker**, PD Dr. H.W. **Vohland**, Prof. Dr. K. **Voigt**, Prof. Dr. **Wagner**, Prof. Dr. W. **Wesemann**, Dr. Dr. W. **Wiegand**, Prof. Dr. P. **von Wichert**, Prof. Dr. O. **Zwisler**

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. F. Kern für die Bereitstellung des Themas, Frau Dr. Gabriele Hensel für die wissenschaftliche Betreuung und Dr. Hemmo Meyer für die wissenschaftliche und technische Unterstützung. Weiterhin danke ich Herrn Volkwin Kramer für einen Teil der fotografischen Arbeiten.

Bochum, im März 2001